

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

RÉGULATION DE LA SYNTHÉTASE DES ACIDES GRAS PAR L'INSULINE
ET LA T3 : MISE EN ÉVIDENCE DE L'ACTION GÉNOMIQUE ET NON
GÉNOMIQUE DE LA T3

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR
ANNE RADENNE

Novembre 2008

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je souhaite tout d'abord remercier ma directrice de recherche Catherine Mounier. Un grand merci, puisque c'est toi qui m'as vraiment donné l'envie de faire de la recherche lors de mon premier stage, cela fait déjà quelques années. J'ai énormément appris sous ta direction, tu nous as appris à être autonome tout en restant disponible pour nos questions.

Et puis nous allons remettre ça pour une paire d'années encore !!!!

Un grand merci à toute l'équipe du laboratoire : toutes les personnes qui ont travaillé sur le projet FAS, Caroline, Sabine et Murielle, sans oublier l'équipe SCD, Daniel, Michèle, Omar et Gab.

Merci, aux professeurs Julie Lafond, Benoît Barbeau, Eric Rassart et François Dragon pour le prêt du matériel, cela nous a beaucoup aidé.

Merci à tous mes amis et collègues du 3^{ème} étage pour vos conseils et votre aide. Pardonnez moi de ne pas vous nommez un à un mais vous êtes assez nombreux.

Et puis bien sûr, merci mille fois à mes parents qui m'ont toujours soutenu dans mes projets. Je sais que ça n'a pas été facile pour vous de me laisser partir aussi loin !

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	viii
AVANT-PROPOS	xii
RÉSUMÉ	xiv
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I	3
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	
1.1 Métabolisme des acides gras	3
1.1.1 Origine des acides gras	4
1.1.2 Synthèse <i>de novo</i> des acides gras	4
1.1.3 Transformations métaboliques des acides gras	7
1.1.4 Lieux de synthèse des acides gras <i>de novo</i>	8
1.1.5 Régulation de la lipogenèse	9
1.1.5.1 Régulation nutritionnelle de la lipogenèse	9
1.1.5.2 Régulation hormonale de la lipogenèse	9
1.2 Le complexe de l'acide gras synthase	11
1.2.1 Organisation structurelle	11
1.2.2 Réactions effectuées par la FAS	12
1.2.3 Le gène FAS et sa région promotrice	14
1.2.4 Expression tissulaire de la FAS	16
1.3 Régulation de l'expression de la FAS	16
1.3.1 Régulation hormonale de la FAS	17

1.3.1.1	Régulation de la FAS par la T3	17
1.3.1.1.1	Synthèse des hormones thyroïdiennes	17
1.3.1.1.2	Mécanisme général d'action des hormones thyroïdiennes	20
1.3.1.1.3	Les récepteurs aux hormones thyroïdiennes	22
1.3.1.1.4	Modulation du mécanisme d'action des TRs	25
1.3.1.1.5	Modifications posttraductionnelles des TRs	27
1.3.1.1.6	Action non génomique des THs	29
1.3.1.1.7	Le TRE sur le promoteur FAS	30
1.3.1.2	Régulation de la FAS par l'insuline	31
1.3.2	Régulation nutritionnelle de la FAS	33
1.3.2.1	Régulation de la FAS par le glucose	33
1.3.2.2	Régulation de la FAS par les PUFAs	34
1.3.2.3	Régulation de la FAS par les MCFAs	34
CHAPITRE II		36
ARTICLE SCIENTIFIQUE		
2.1	Abstracts	38
2.2	Introduction	39
2.3	Materials and methods	42
2.3.1	Materials	42
2.3.2	Plasmid constructs	42
2.3.3	Cell culture and transfection	43
2.3.4	FAS activity	43
2.3.5	Analysis of mRNA expression level	44
2.3.6	Analysis of promoter activity	45
2.3.7	Gel electromobility shift assay	45
2.3.8	Western blot	45
2.4	Results	47
2.4.1	Role of T3 and insulin on FAS enzymatic activity, protein and mRNA level	47
2.4.2	Effects of insulin and T3 at the transcriptionnal level	47
2.4.3	Role of phosphorylation in the regulation of FAS	49
2.4.4	Role of the PI3-kinase and Erk1/2 MAPK pathways in the regulation of FAS in response to T3 and insulin	49

2.5	Discussion	52
2.6	References	57
2.7	Figure legends	68
CHAPITRE III		83
DISCUSSION		
CONCLUSION		90
REFERENCES		91

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1: Principales étapes de la synthèse <i>de novo</i> des acides gras	6
Figure 1.2: Famille des acides gras polyinsaturés	8
Figure 1.3: Le complexe de l'acide gras synthase	13
Figure 1.4: Comparaison des séquences promotrices du gène FAS de l'humain, de la souris, du rat, du poulet et de l'oie.	15
Figure 1.5: La synthèse des hormones thyroïdiennes	19
Figure 1.6: Modèle général d'action des hormones thyroïdiennes	21
Figure 1.7: Organisation des différents TREs	21
Figure 1.8: Comparaison des différentes isoformes des récepteurs aux hormones thyroïdiennes	23
Figure 1.9: Structure générale des récepteurs nucléaires	24
Figure 1.10: Représentation schématique du domaine en doigts de zinc localisé sur le TR β humain	25
Figure 1.11: Modèle moléculaire de la répression basale en absence de T3 et de l'activation de la transcription en présence de T3	27
Figure 1.12: Shéma récapitulatif du mécanisme d'action génomique et non génomique des THs	30
Figure 2.1: Effects of T3 and insulin on FAS enzymatic activity, protein and mRNA levels	73
Figure 2.2: Localization of the TRE on the goose FAS gene promoter	74
Figure 2.3: Mobility shift assays using the fragment located between -732 and -692 bp of the goose FAS gene	75
Figure 2.4: Role of phosphorylation in the regulation of FAS activity and transcription in response to T3 and insulin treatments	76
Figure 2.5: Effects of LY294002 and PD98059 on FAS activity and	

TRE-mediated transcription in response to T3 and insulin treatments	78
Figure 2.6: Effect of T3 and insulin on the level of Erk1/2 MAPK phosphorylation	79
Figure 2.7: Effect of PD98059, UO126 and LY294002 on T3 and insulin-induced Erk1/2 MAPK phosphorylation	80
Figure 2.8: Effect of T3 and insulin on the level of Akt phosphorylation	81
Figure 2.9: Schematic representation of the FAS transcriptional regulation in response to T3 and insulin	82

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

ACC: Acetyl-coA carboxylase

ACP: *Acyl carrier protein*

ADN: Acide désoxyribonucléique

AGRP: *Agouti-related peptide*

AMPc: Adénosine monophosphate cyclique

AMPK : AMP Kinase

ARNm: Acide ribonucléique messenger

ATF2: *Activating transcription factor 2*

CART: *cocaine-amphetamine related transcript*

CBP: *CREB Binding protein*

CEH: *Chick embryo hepatocytes*

ChIP: *Chromatin Immunoprecipitation*

ChREBP: *Carbohydrate Responsive Element Binding Protein*

CPT-1: Carnitine palmitoyl transférase

DBD: *DNA binding domain*

DIT: Diiodo-tyrosine

DR4: *Direct Repeat 4*

DRIPs: *Vitamin D receptor interacting proteins*

eNOS: *Endothelial nitric oxide synthase*

ERK: *Extracellular signal regulated kinase*

GH: *Growth Hormone*

GPCR: *G protein-coupled receptor*

HAT: *Histone acetyltransferase*

HDAC: *Histone deacetylase*

HDL: *High density lipoprotein*

HPRT-1: *Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1*

IP: *Invert palindrome*

IMC: *Indice de masse corporel*

IR: *Insulin receptor*

IRE: *Insulin response element*

IRS : *Insulin Receptor substrate*

Kpb: *Kilo paire de base*

kD: *Kilo Dalton*

LBD: *Ligand binding domain*

MAPK: *Mitogen activated protein kinase*

MCFA: *Medium chain fatty acid*

ME: *Malic enzyme*

MEK: *Map-erk kinase*

MIT: *Monoiodo-tyrosine*

mTOR: *Mammalian target of rapamycin*

NADPH: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NCor: *Nuclear co-repressor*

NF-Y: *Nuclear factor Y*

OMS: Organisation mondiale de la santé

Pal: Palindrome

pb: Paire de base

PDK1 : Pyruvate dehydrogenase kinase 1

PCAF: *p300 CBP associated factor*

PKA: *Protein kinase A*

PKB: *Protein kinase B*

PKC: *Protein kinase C*

PI3-Kinase: Phosphatidy1-inositol-3 phosphate kinase

PIP2: Phosphoinositol di-phosphate

PIP3: Phosphoinositol tri-phosphate

POMC: *Pro-opiomelanocortin*

PUFA: *Polyunsaturated fatty acid*

SCAP : *SREBP cleaving-activating protein*

SCD : Stearyl-CoA désaturase

SF1: *Steroidogenic factor-1*

SMRT: *Silencing mediator of RAR and TR*

SRC: *Steroid receptor co-activators*

SRE: *Sterol response element*

SREBP-1: *Sterol response element binding protein 1*

rT3: *Reverse T3*

STAT: *Signal Transducers and Activator of Transcription*

RT: *Reverse transcriptase*

RXR: *Retinoid X receptor*

T3: *Triiodothyronine*

T4: *Thyroxine*

Tg: *Thyroglobuline*

TH: *Thyroid hormone*

TK: *Thymidine kinase*

TRAPs: *TR-associated proteins*

TRE: *T3 response element*

USF: *Upstream stimulatory factors*

VLDL: *Very low density lipoprotein*

AVANT-PROPOS

1. Contribution de l'étudiant à l'expérimentation et la rédaction.

☑ Ce qui a été réalisé par l'étudiante

- ✓ Les transfections et les mesures des activités CAT
- ✓ Les expériences d'immunobuvardage
- ✓ Les expériences de retards sur gel
- ✓ La mise au point des RT-PCR FAS
- ✓ Participation à la rédaction de l'article scientifique

☒ Ce qui n'a pas été réalisé par l'étudiante

- ✗ La localisation du TRE
- ✗ Les clonages du TRE, DR4 et 1,6FAS dans différents vecteurs
- ✗ La mesure des activités FAS

2. Liste des auteurs de l'article scientifique

Radenne A, Akpa M, Martel C, Sawadogo S, Mauvoisin D et Mounier C

3. Statut de la publication

Article accepté dans American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism.

2008 Oct; 295(4):E884-94. Epub 2008 Aug 5.PMID: 18682535

[PubMed - in process]

4. Autres travaux réalisés par l'étudiante pendant la maîtrise

Role of the PI3-kinase/mTOR pathway in the regulation of stearoyl CoA desaturase (SCD1) gene expression by insulin in liver.

Mauvoisin D, Rocque G, Arfa O, Radenne A, Boissier P, Mounier C.

J Cell Commun Signal. 2007 Sep;1(2):113-25. Epub 2007 Oct 6.

PMID: 18481202 [PubMed - in process]

☑ Ce qui a été réalisé par l'étudiante

✓ Les expériences de retard sur gel

RÉSUMÉ

La synthétase des acides gras (FAS) est une enzyme clef de la lipogenèse hépatique responsable de la synthèse des acides gras saturés à longue chaîne. Cette enzyme est régulée au niveau transcriptionnel par les nutriments et les hormones. Ainsi, le glucose, l'insuline et la T3 augmentent son activité alors que les acides gras à moyennes chaînes (MCFAs), les acides gras poly-insaturés (PUFAs) et le glucagon la diminuent.

Dans des cellules hépatiques, nous avons mis en évidence que la T3 et l'insuline étaient capables d'activer de façon synergique l'activité enzymatique et le niveau d'expression des ARNm de la FAS (14 fois). L'analyse du promoteur a permis de démontrer que cette activation était aussi transcriptionnelle. Par la suite l'élément de réponse à la T3 (TRE) a été localisé dans la région promotrice du gène FAS. Ce TRE fixe un hétérodimère TR/RXR en absence d'hormone et cette fixation est augmentée en présence d'insuline et/ou de T3.

L'utilisation de H7, un inhibiteur général des serines/thréonines kinases, nous a permis de mettre en évidence que des mécanismes de phosphorylation sont impliqués dans la régulation transcriptionnelle de la FAS par ces deux hormones. En fait, nous avons démontré que la voie de signalisation cellulaire PI3-Kinase/ERK1/2-MAPK est impliquée dans la régulation de la FAS par la T3 via le TRE. De plus, nous avons aussi mis en évidence un effet de l'insuline sur ce TRE qui impliquerait la même voie de signalisation ainsi qu'une voie qui pourrait aussi impliquer Akt. Les mêmes effets non génomiques de la T3 et de l'insuline sont aussi observés au niveau d'un TRE consensus de type DR4.

En conclusion, nos résultats suggèrent que la T3 régule la transcription par un mécanisme d'action à la fois génomique et non génomique impliquant la voie PI3-Kinase/MAPK et que l'insuline est aussi capable de cibler ce TRE par des voies de signalisation spécifiques.

Mots clés : FAS, T3, Insuline, PI3-Kinase, Erk1/2-MAPK

INTRODUCTION

Le surpoids et l'obésité ne cessent de progresser dans le monde. L'organisation mondiale de la santé (OMS) utilise le terme de « globésité » pour désigner la pandémie croissante d'obésité. D'après l'OMS, plus de 1 milliard d'adultes présentent un excès de poids et au moins 300 millions d'entre eux sont obèses. Aux Etats-Unis, 30% des américains sont obèses et plus de 65% présentent une surcharge pondérale. La situation au Canada n'est guère plus réjouissante (45% de la population présente un surpoids). Cet excès de poids est principalement due à une modification du régime alimentaire dont une augmentation du ratio calorique et notamment une augmentation de l'apport en graisse, en sel et en sucre. De plus, l'augmentation générale de la sédentarité amplifie ce phénomène. Ces kilos superflus constituent une véritable menace pour la santé. L'augmentation de l'indice de masse corporelle est un facteur de risque majeur pour le développement des maladies cardiovasculaires, le diabète de type 2 ainsi que certains types de cancers. Le surpoids et l'obésité sont donc des fardeaux économiques importants pour le système de santé canadien.

Des études récentes ont mis en évidence une implication directe de la synthèse *de novo* des lipides (lipogenèse) dans le développement de l'obésité (Kusunoki, Kanatani et al. 2006). La synthétase des acides gras (FAS) (EC 2.3.1.85) est une des enzymes clefs de la lipogenèse hépatique. Cette enzyme est impliquée dans la formation des acides gras saturés à longue chaîne (Wakil 1989). Le traitement d'animaux avec un inhibiteur spécifique de la FAS, le C75, induit une perte de poids importante, cependant cet inhibiteur a de graves effets anoréxiques (Loftus, Jaworsky et al. 2000). Ces études démontrent que la FAS pourrait être une cible thérapeutique intéressante pour lutter contre l'obésité. C'est pour cette raison qu'il est important de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de l'activité et de l'expression de cette enzyme.

La FAS est régulée par les nutriments et les hormones dont les concentrations varient au cours de la prise alimentaire. La T3 (Stapleton, Mitchell et al. 1990) et l'insuline (Sul, Wang 1998), deux hormones fortement augmentées après la prise alimentaire augmentent l'activité de la FAS. Par contre, les MCFAs (acides gras à moyennes chaînes) (Roncero et Goodridge 1992), les PUFAs (acides gras polyinsaturés) (Moon, Latasa et al. 2002) et le glucagon (Lakshmanan, Nepokroeff et al. 1972) diminuent l'activité de cette enzyme.

L'objectif de ce projet de maîtrise est de caractériser les mécanismes moléculaires d'action de la T3 et de l'insuline (Kusunoki, Kanatani et al. 2006) sur la régulation de l'activité et de l'expression de la FAS dans des cellules hépatiques.

CHAPITRE I

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1 Métabolisme des acides gras

Le métabolisme lipidique représente un ensemble de processus anaboliques et cataboliques visant à la production de divers composés, tels que les phospholipides (principaux constituants des membranes cellulaires), certaines hormones (hormones stéroïdiennes), ainsi que la production et le stockage d'énergie sous forme de triacylglycérols. Les graisses (triacylglycérols) constituent les plus importantes réserves d'énergie chez les animaux et constituent des formes de stockage d'énergie hautement concentrée. Elles sont en particulier mises en réserve dans les cellules du tissu adipeux, les adipocytes, où elles subissent un cycle permanent de synthèse et de dégradation.

La synthèse de *novo* des triacylglycérols aussi appelée lipogenèse, peut être définie comme l'ensemble des activités cellulaires visant à la formation des acides

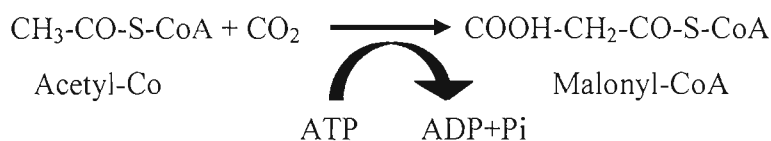
gras à partir de divers précurseurs tels que les acides gras eux-mêmes, les sucres, les protéines et leurs mises en réserve sous forme de triacylglycérols.

1.1.1 Origine des acides gras

Le principal précurseur impliqué dans la voie de biosynthèse des acides gras est l'acétyl-CoA (Lynen et Ochoa 1953). Il représente la source de tous les atomes de carbone des acides gras. L'origine de l'acétyl-CoA est diverse. Il provient soit de la décarboxylation oxydative du pyruvate, soit de la dégradation de certains acides aminés ou encore de la β -oxydation des acides gras à longue chaîne.

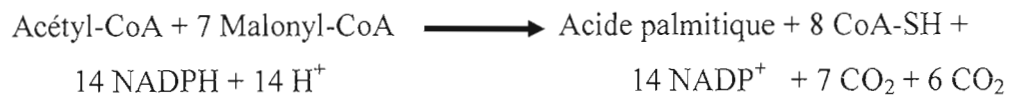
1.1.2 Synthèse *de novo* des acides gras

La synthèse *de novo* des acides gras se déroule en 2 étapes distinctes (figure 1.1). La première étape est la carboxylation de l'acétyl-CoA en malonyl-CoA. Cette réaction est catalysée dans le cytoplasme de la cellule par une enzyme clef de la synthèse des acides gras : l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) (Munday 2002).



Par la suite, la synthèse des acides gras s'effectue grâce à l'acide gras synthase (FAS). Cette enzyme multifonctionnelle fixe une molécule d'acétyl-CoA et l'allonge en utilisant des groupements malonyl au cours de 7 cycles de réaction pour aboutir au palmitate (C16 :0). Le malonyl-CoA, substrat de cette réaction d'élongation, libère son groupement carboxyl sous forme de CO_2 lors de la réaction de condensation. Cette réaction requiert la présence d'un agent réducteur le NADPH, cofacteur généré

par l'enzyme malique (ME) lors de la décarboxylation oxydative du malate en pyruvate (Wakil, Stoops et al. 1983; Wakil 1989). L'allongement des acides gras catalysés par l'acide gras synthase s'arrête à C16 libérant ainsi l'acide palmitique (C16 :0). Cependant, le stéarate (C18 :0), le myristate (C14 :0) mais également des acides gras à plus courte chaîne peuvent être synthétisés (Semenkovich 1997). Par exemple, des acides gras à moyenne chaîne sont synthétisés par la synthétase des acides gras de la glande mammaire et sont retrouvés au niveau du lait excrété (Tai, Chirala et al. 1993).



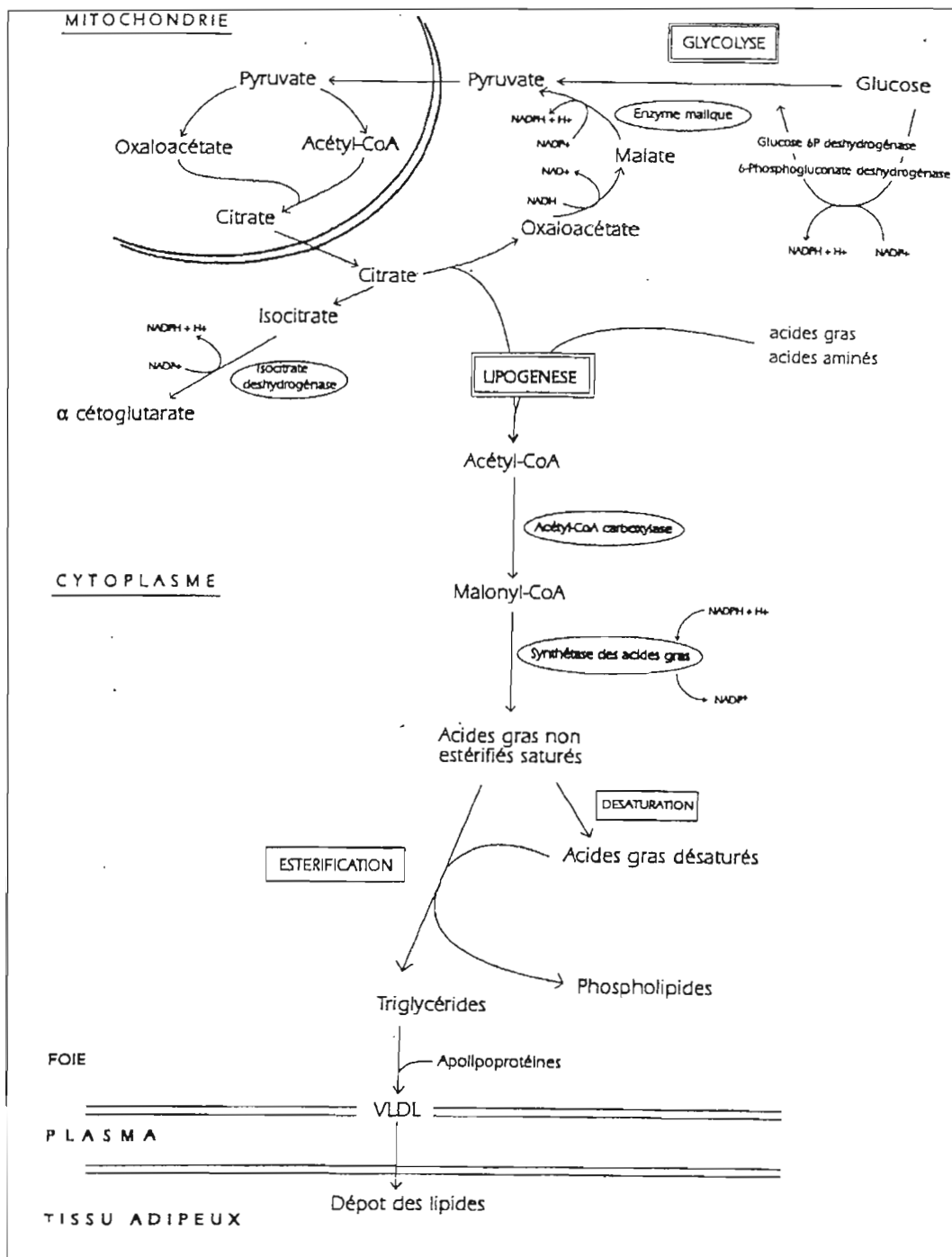


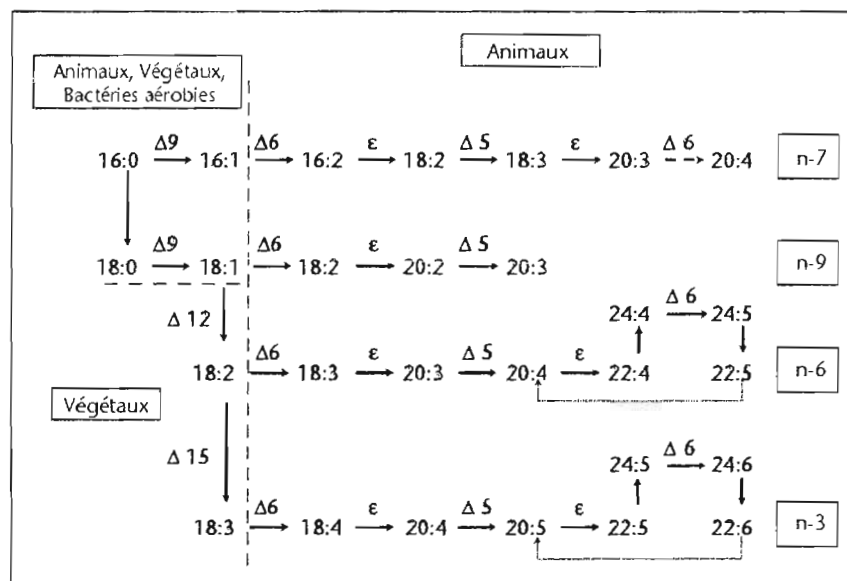
Figure 1.1: Principales étapes de la synthèse de *novo* des acides gras
(Mounier 1994)

1.1.3 Transformations métaboliques des acides gras

A partir du palmitate ainsi formé, des acides gras à très longues chaînes et des acides désaturés vont pouvoir être générés. Les acides gras C16 :0 et C18 :0 peuvent être allongés à nouveau, soit au niveau de la mitochondrie, soit dans le réticulum endoplasmique. Dans la mitochondrie, les acides gras saturés possédant 12 à 16 carbones peuvent subir une élongation par une addition successive de molécules d'acétyl-CoA, ce qui conduit à la formation d'acides gras à chaînes très longues (C18 à C26). Dans le réticulum endoplasmique, ces acides gras saturés ou non saturés peuvent aussi subir une élongation supplémentaire par une addition successive de malonyl-CoA. La réaction est la même que pour la synthèse du palmitate (Jakobsson, Westerberg et al. 2006).

Les acides gras saturés à longue chaîne peuvent être désaturés par l'introduction d'une double liaison. Cette réaction est catalysée par des désaturases. La stéaroyl-CoA désaturase (SCD1) encore appelée la $\Delta 9$ désaturase, localisée dans le réticulum endoplasmique, est une des enzymes clefs de la désaturation. Elle désature les acides gras en ajoutant une double liaison en position 9. L'acide palmitoléique (C16 :1) et l'acide oléique (C18 :1) sont produits par désaturation respectivement de l'acide palmitique (C16 :0) et de l'acide stéarique (C18 :0) (figure 1.2).

La biosynthèse des triacylglycérols s'effectue alors à partir d'acides gras activés (acyl-CoA) et de glycérol-3-phosphate issus de la glycolyse ou encore de la phosphorylation du glycérol. Les triacylglycérols seront ensuite intégrés par les hépatocytes dans des lipoprotéines (VLDL) et libérés dans le sang pour alimenter les autres tissus ou être mis en réserve dans les adipocytes (figure 1.1).



1.1.5 Régulation de la lipogenèse

1.1.5.1 Régulation nutritionnelle de la lipogenèse

La lipogenèse est très sensible aux modifications alimentaires. Les acides gras polyinsaturés (PUFAs) diminuent la lipogenèse hépatique en inhibant l'expression de différents gènes, telle que la FAS, spot 14 et SCD1 (Jump, Clarke et al. 1994). Par contre, une alimentation riche en sucres va stimuler la lipogenèse à la fois dans le foie et le tissu adipeux, entraînant une augmentation postprandiale du niveau de triglycérides plasmatiques (Kersten 2001). La diminution de la lipogenèse induite par une restriction alimentaire peut s'expliquer en partie par une diminution plasmatique du glucose, ainsi que par une augmentation des PUFAs libres circulants (Kersten 2001).

Le glucose plasmatique va stimuler la lipogenèse via différents mécanismes. Premièrement, le glucose est le principal substrat de la lipogenèse, puisqu'il y est rapidement converti en acetyl-CoA par la glycolyse (Kersten 2001). De plus, le glucose est capable de réguler directement la transcription des gènes lipogéniques (Kersten 2001), notamment grâce à l'activation et la fixation sur des séquences promotrices du facteur de transcription ChREBP (Carbohydrate Responsive Element Binding Protein). Des séquences de fixation de ce facteur de transcription sont d'ailleurs retrouvées sur le promoteur de la FAS, de la fructose 6 phosphate 2 kinase/fructose-2,6- biphosphatase et de l'ACC (Uyeda, Yamashita et al. 2002). Enfin, le glucose stimule la lipogenèse en augmentant la libération d'insuline et en inhibant la libération de glucagon par le pancréas (Kersten 2001).

1.1.5.2 Régulation hormonale de la lipogenèse

Une restriction alimentaire est associée à une importante modification de la concentration des hormones plasmatiques, notamment une diminution du niveau d'insuline, de T3 et de leptine ainsi qu'une augmentation du niveau d'hormone de

croissance (GH) et de glucagon (Kersten 2001). L'insuline est l'hormone qui a probablement la plus grande influence sur la lipogenèse (Kersten 2001). L'insuline augmente l'entrée de glucose dans la cellule en favorisant la translocation du transporteur au glucose (GLUT4) à la surface des cellules hépatiques (Kersten 2001). L'insuline est également impliquée dans les modifications post-traductionnelles des enzymes glycolytiques et lipogéniques. L'insuline stimule la lipogenèse en modifiant les liaisons covalentes de ces enzymes (Kersten 2001). Enfin, l'insuline est capable d'activer différentes voies de signalisation cellulaire en se fixant sur son récepteur membranaire (Nakae et Accili 1999) modulant ainsi la transcription des gènes lipogéniques. La T3 est bien connue pour stimuler la lipogenèse, son action est médiée par la fixation d'un complexe hormone/récepteur sur les séquences promotrices de certains gènes impliqués dans le lipogenèse (Stapleton, Mitchell et al. 1990; Thurmond et Goodridge 1998).

L'hormone de croissance (GH) est une hormone qui a une grande importance dans la régulation de la lipogenèse. Cette hormone réduit de façon très importante la lipogenèse au niveau du tissu adipeux et induit un important gain de masse musculaire (Kersten 2001) (Etherton 2000). La leptine est une hormone produite par le tissu adipeux découverte récemment (Zhang, Proenca et al. 1994). La leptine diminue le stockage de graisse en régulant la prise alimentaire mais également en agissant au niveau du métabolisme énergétique dans de nombreux tissus, notamment le tissu adipeux et le foie (Kersten 2001). Par exemple, il a été mis en évidence que la leptine est impliquée dans l'inhibition des gènes impliqués dans la synthèse des acides gras ainsi que dans la synthèse des triglycérides (Wang, Lee et al. 1999). Le facteur de transcription SREBP-1 est également une cible potentielle de la leptine par lequel elle inhiberait la transcription des gènes lipogéniques (Kakuma, Lee et al. 2000). Le glucagon est impliqué dans l'inhibition de la transcription de nombreux gènes lipogéniques (FAS, ME). Cette hormone induit une augmentation de l'AMPc, ce qui entraîne l'activation de la PKA qui par la suite va modifier la fixation de

facteurs de transcription, c-Jun et ATF2 sur un élément de réponse négatif à l'AMPc localisé sur le promoteur de l'enzyme malique (Mounier, Chen et al. 1997).

1.2 Le complexe de l'acide gras synthase

1.2.1 Organisation structurelle

La biosynthèse des acides gras requiert une série de réactions enzymatiques. Chez les organismes comme la bactérie, chaque étape est catalysée par des enzymes indépendantes (Wakil 1983). Chez les mammifères et les oiseaux, ces différentes étapes sont réalisées au sein d'une même protéine formant un complexe multicatalytique. Cette protéine multifonctionnelle est le produit d'un gène unique. La FAS des vertébrés est fonctionnelle sous forme d'un homodimère constitué de 2 chaînes peptidiques de 250 kDa (Stoops, Arslanian et al. 1975). Chacune de ces unités peut catalyser 7 réactions partielles distinctes, nécessaires à la synthèse du palmitate. Le rapprochement spatial de plusieurs réactions enchaînées l'une derrière l'autre, présente un avantage par rapport à des enzymes séparées. La compétition entre les réactions est évitée, la réaction se déroule sous forme coordonnée et cette réaction est très efficace grâce à la concentration élevée en substrat.

Chaque moitié de l'acide gras synthase peut lier le substrat (résidu acyl ou acétyl) sous forme d'un thioester au niveau de 2 groupements SH particuliers : un sur un résidu cystéine (Cys-SH) et un autre sur un groupement 4'phosphopantéthéine (Pan-SH). La Pan-SH est associée à un fragment du complexe que l'on nomme ACP (Acyl Carrier Protein). Cette partie de l'enzyme fonctionne comme un long bras qui fixe le substrat et le déplace ensuite d'un centre actif à un autre. Les 2 moitiés de l'acide gras synthase coopèrent dans ce domaine. Le complexe enzymatique n'est donc fonctionnel que sous forme dimérique. La dissociation de l'enzyme en monomères conduit à l'inactivation de la FAS (Stoops, Arslanian et al. 1975; Lornitzo, Qureshi et al. 1975). De façon spatiale, les activités enzymatiques sont réparties en 3 domaines

distincts. Le premier domaine catalyse l'introduction du substrat, acétyl-CoA et malonyl-CoA, grâce aux activités [ACP]-S-acétyl transférase (figure 1.3.A.1) et [ACP]-S-malonyl-transférase (figure 1.3.A.2) qui sont par la suite condensés via la 3-céto-acyl-[ACP]-synthase (figure 1.3.A.3). Le deuxième domaine réduit la chaîne d'acide gras au cours de la synthèse à l'aide de la 3-cétoacyl-[ACP]-réductase (figure 1.3.A.4), de la 3 hydroxyacyl-[ACP]-déhydratase (figure 1.3.A.5), et de l'énoyl-[ACP]-réductase (figure 1.3.A.6). Le troisième domaine sert à libérer le produit fini après sept étapes d'allongement de la chaîne grâce à l'activité acyl-[ACP]-hydrolase (figure 1.3.A.7) (Koolman, Röhm 1999).

1.2.2 Réactions effectuées par la FAS

La première réaction réalisée par la FAS est le transfert d'un groupement acétyl sur le résidu cystéine (figure 1.3.B.1) et le transfert d'un résidu malonyl sur la 4-phosphopantéthéine (Pan-SH) de l'ACP (figure 1.3.B.2). Par la suite, l'élongation a lieu par le transfert d'un groupement acétyl en C-2 du résidu malonyl. Le groupement carboxyl libre est alors clivé et forme du CO_2 (figure 1.3.B.3). Par la suite, il y a réduction du groupement 3-céto (figure 1.3.B.4), élimination de l'eau (figure 1.3.B.5), puis réduction (figure 1.3.B.6). L'ensemble de ces réactions aboutit à la formation d'un acide gras à 4 carbones. Ce produit est par la suite transféré de l'ACP sur le résidu cystéine par l'acyl-transférase (figure 1.3.B.1) afin qu'un nouveau cycle puisse recommencer après un nouveau chargement de l'ACP par du malonyl-CoA. Au bout de 7 cycles, l'acyl-[ACP]-hydrolase (figure 1.3.B.7) libère le produit final : le palmitate ($\text{C}_{16} : 0$) (Koolman, Röhm 1999).

Figure 1.3: Le complexe de l'acide gras synthase (Koolman, Röhm 1999)

1.2.3 Le gène FAS et sa région promotrice

Chez les vertébrés, la FAS est codée par un gène unique localisé sur le chromosome 17q25 chez l'humain et sur le chromosome 11 chez la souris (Semenkovich, Coleman et al. 1995). En dépit de la taille importante de sa protéine, le gène FAS est relativement petit. La région codante représente environ 50 kpb chez l'oie, 18 kpb chez le rat et moins de 40 kpb chez l'homme (Semenkovich 1997). Le gène FAS est bien conservé entre les espèces avec une homologie d'environ 80% (Amy, Witkowski et al. 1989; Holzer, Liu et al. 1989).

Le gène FAS génère un seul ARNm chez la souris et 2 ARNm chez le rat et le poulet suite à un épissage alternatif (Sul et Wang 1998). Chez le rat, on retrouve 43 exons et 42 introns espacés par des séquences GT/AG, séquences universelles connues servant à l'épissage alternatif (Amy, Williams-Ahlf et al. 1992). Il est important de noter que les introns correspondent aux zones charnières situées entre chacune des sous unités catalytiques du complexe multienzymatique de la FAS. Chez les plantes et les bactéries, les acides gras saturés à longues chaînes sont synthétisés par une succession d'enzymes monofonctionnelles codées par des gènes indépendants. L'ensemble de ces observations suggèrent donc que la FAS des vertébrés est issue de la fusion de plusieurs gènes ancestraux (Amy, Williams-Ahlf et al. 1992).

Les éléments nécessaires à la régulation transcriptionnelle de la FAS semblent être situés dans les premiers 2,1 kpb du promoteur (Wang, Jones Voy et al. 2004). Une analyse informatique de cette région promotrice chez différentes espèces a permis d'identifier de nombreux éléments consensus (Wang, Jones Voy et al. 2004) (figure 1.4) dont certains IREs (Elements de réponses à l'insuline) déjà bien caractérisés (Sul et Wang 1998).

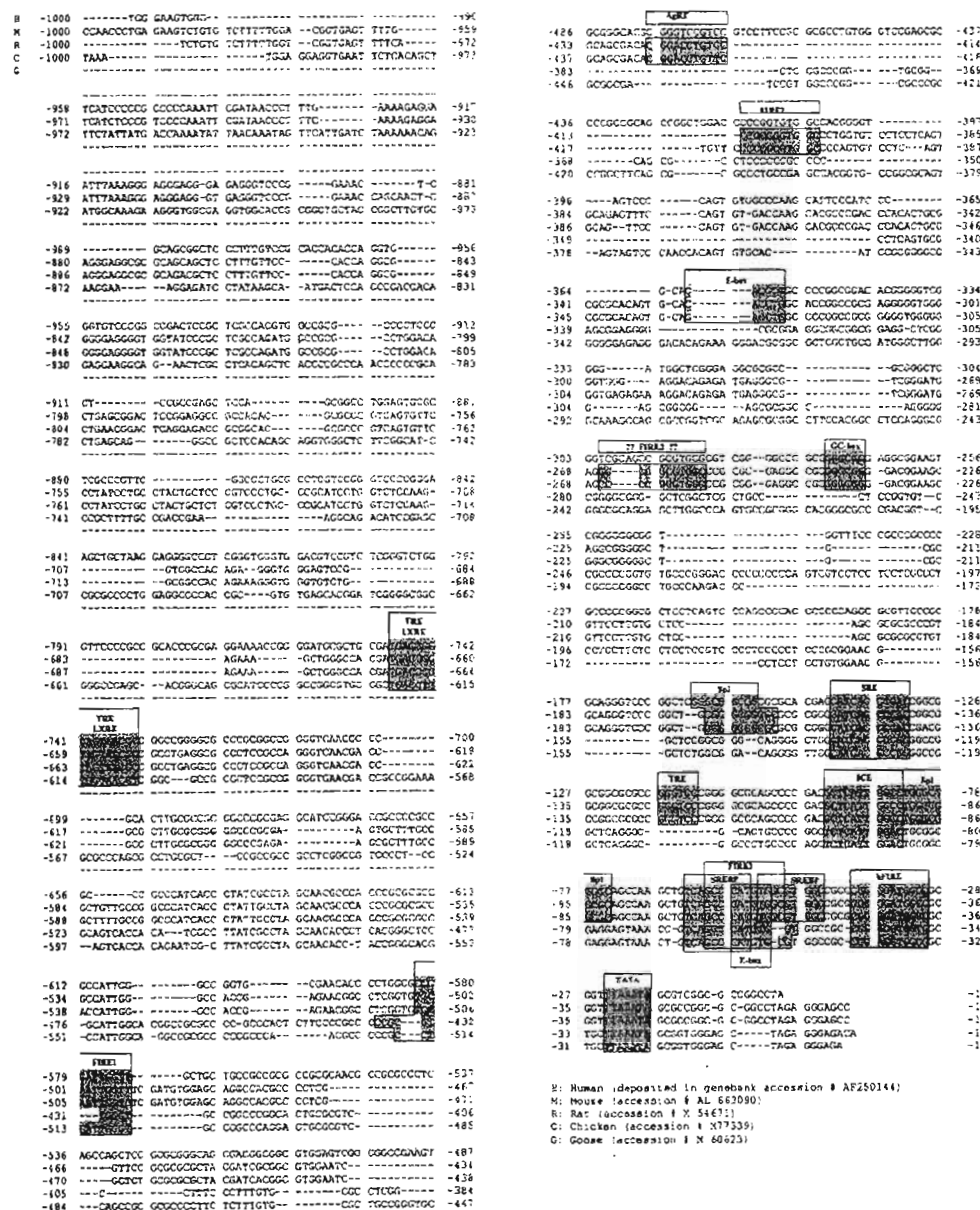


Figure 1.4: Comparaison des séquences promotrices du gène FAS de l'humain, de la souris, du rat, du poulet et de l'oie. Les séquences encadrées représentent des éléments de régulation. Abréviations : AgRE, agouti response element ; E-box consensus, CANNTG ; GC-box consensus, GGGCGG ; hFIRE, hepatic FAS insulin response element ; ICE, inverted CAATT element ; LXRE, liver X receptor element ; Sp1, stimulatory protein 1 ; SRE, sterol response element ; TATA, TATA-box ; TRE, thyroid response element (Wang, Jones Voy et al. 2004).

1.2.4 Expression tissulaire de la FAS

Chez l'homme, l'expression de l'ARNm FAS est ubiquitaire. Cependant, son niveau d'expression varie d'un tissu à l'autre (Semenkovich 1997). Le plus haut niveau d'expression de l'ARNm FAS est retrouvé au niveau du foie et des poumons chez l'humain (Semenkovich, Coleman et al. 1995). Chez les rongeurs, la lipogenèse a lieu en grande partie au niveau du tissu adipeux, ce qui n'est pas le cas chez l'humain. Cependant, un haut niveau d'expression de l'ARNm FAS est retrouvé chez l'humain au niveau du tissu adipeux intra abdominal (Semenkovich, Coleman et al. 1995), suggérant que son niveau d'expression pourrait varier et dépendre de l'origine du tissu adipeux (Semenkovich 1997).

1.3 Régulation de l'expression de la FAS

La FAS, enzyme clef de la lipogenèse hépatique est régulée par les hormones et les nutriments. Au niveau hépatique, son activité est inhibée par une diète et augmentée par une réalimentation riche en sucre (Burton, Collins et al. 1969) (Goodridge, Back et al. 1986). La FAS est régulée à la fois au niveau transcriptionnel (Katsurada, Iritani et al. 1990; Back, Goldman et al. 1986; Iritani, Nishimoto et al. 1992) et post-transcriptionnel (Wilson, Back et al. 1986; Moustaid and Sul 1991; Semenkovich, Coleman et al. 1993). La T3 (Stapleton, Mitchell et al. 1990) et l'insuline (Paulauskis et Sul 1989) augmentent le niveau d'expression des ARNm de la FAS. Quand les 2 hormones sont ajoutées en même temps, un effet synergique est observé (Stapleton, Mitchell et al. 1990). De façon très intéressante, l'ajout de MCFAs (hexanoate et octanoate) induit une inhibition de la FAS au niveau transcriptionnel (Roncero et Goodridge 1992). Cette inhibition est spécifique et réversible.

1.3.1 Régulation hormonale de la FAS

1.3.1.1 Régulation de la FAS par la T3

Il est connu que la T3 augmente le niveau d'expression des ARNm FAS (Stapleton, Mitchell et al. 1990), mais le mécanisme moléculaire de régulation n'est pas encore caractérisé et c'est le but précis de notre étude. Nous allons donc nous attarder dans cette partie sur le mécanisme général d'action des hormones thyroïdiennes.

1.3.1.1.1 Synthèse des hormones thyroïdiennes

Les hormones thyroïdiennes (THs) sont synthétisées au niveau de la glande thyroïde qui est située juste en avant de la trachée. Cette glande est formée de 2 lobes latéraux réunis par l'isthme et un petit lobe pyramidal. Au niveau microscopique, on trouve des structures particulières : les follicules thyroïdiens. Ces follicules sont bien individualisés par des travées de tissu conjonctif et sont constitués par un épithélium pavimenteux qui délimite une lumière : le colloïde. On trouve un autre type de cellules appelées cellules C (cellules à calcitonine) ou cellules parafolliculaires, qui sont impliquées dans le métabolisme phosphocalcique.

Les hormones thyroïdiennes sont synthétisées au niveau des follicules thyroïdiens à partir d'un acide aminé la tyrosine. L'iode est indispensable à la synthèse de ces hormones. Il est capté au niveau du pôle basal des cellules par un mécanisme actif (pompe Na/I) (Dai, Levy et al. 1996), puis il traverse les cellules pour rejoindre le pôle apical et être transformé en iode inorganique (I_2) par la thyroïde peroxydase en présence de peroxyde d'hydrogène (Yen 2001). L'iode inorganique va par la suite être incorporé au niveau d'un résidu tyrosine d'une glycoprotéine de 660-kDa : la thyroglobuline (Tg). La Tg peut fixer un à deux atomes d'iodes formant ainsi des MIT (monoiodo-tyrosines) ou des DIT (diiodo-tyrosines) qui vont par la suite se

coupler grâce à une enzyme ; la thyroperoxydase pour former la T3 et la T4 (thyroxine) (figure 1.5). Les Tg contenant les MIT, les DIT, la T3 et la T4 sont stockées au niveau du colloïde dans la lumière des follicules thyroïdiens, ce qui constitue la principale réserve en hormones thyroïdiennes. Par la suite, la sécrétion des hormones THs nécessite l'endocytose des Tg iodées (contenant les MIT, les DIT, la T3 et la T4) au niveau de la surface apicale des cellules folliculaires thyroïdiennes. Les Tg internalisées sont ensuite incorporées dans des phagolysosomes et soumises à une digestion protéolytique afin d'aboutir à la libération dans la cellule des MIT, des DIT, de la T3 et de la T4. Les MIT et les DIT sont par la suite recapturés au niveau apical alors que la T3 et la T4 sont libérées dans la circulation sanguine au niveau du pôle basal de la cellule folliculaire. La grande majorité des THs produites par les follicules thyroïdiens est libérée sous forme de T4.

La T4 sécrétée par les follicules thyroïdiens possède une activité biologique faible alors que la T3 qui possède une activité biologique élevée est produite dans les tissus cibles à partir de la T4. La T3 est produite dans la majorité des cas, via un mécanisme de déiodination en 5' de la T4 et fait intervenir des sélénoenzymes : les déiodases (Kohrle 2000; Larsen et Berry 1995).

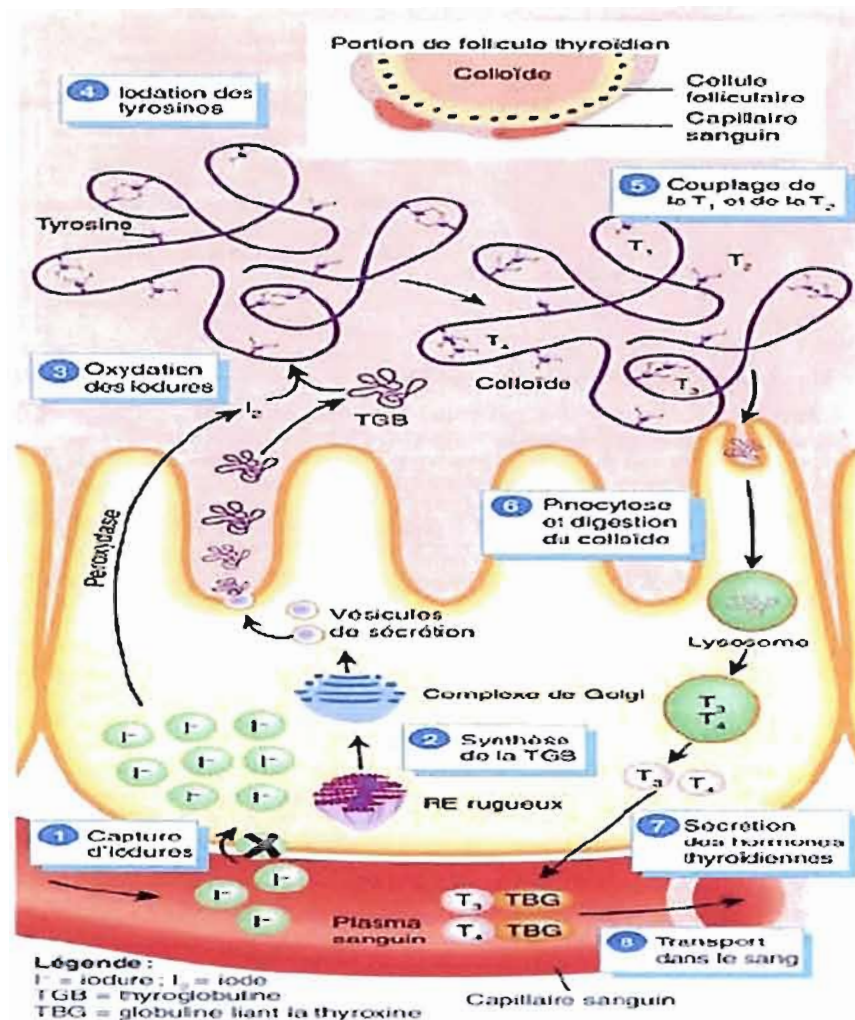


Figure 1.5: La synthèse des hormones thyroïdiennes (Biologie humaine, Elaine Marieb, Edition ERPI)

1.3.1.1.2 Mécanisme général d'action des hormones thyroïdiennes

Les hormones thyroïdiennes sont des hormones nucléaires et jusque récemment étaient considérées comme ne possédant pas de récepteurs membranaires. Elles pénètrent dans la cellule par diffusion à travers la membrane cellulaire puis sont exportées jusqu'au noyau. De nombreuses études ont mis en évidence que les récepteurs nucléaires aux hormones thyroïdiennes (TRs) sont impliqués dans la régulation génique induite par la T3. En présence de T3, ces récepteurs sont capables de fixer l'hormone et de s'associer à la chromatine avec une grande affinité et spécificité (Oppenheimer, Schwartz et al. 1987; Samuels, Forman et al. 1988). Le complexe formé par le récepteur et son ligand va reconnaître des éléments spécifiques de réponse aux hormones thyroïdiennes (TREs) localisés sur le promoteur de certains gènes cibles. Le TR peut se fixer sur son élément de réponse sous forme de monomère, d'homodimère ou encore d'hétérodimère (Forman, Casanova et al. 1992). Il a été mis en évidence que le TR forme un hétérodimère avec des protéines nucléaires du foie (Murray et Towle 1989). Ces protéines isolées ont été appelées les protéines auxiliaires (TRAPs) et ont la propriété d'augmenter la fixation du TR sur le TRE (Murray et Towle 1989) (Darling, Burnside et al. 1989). Par la suite, il a été démontré que les RXRs (récepteurs à l'acide rétinoïque) étaient les principaux TRAPs (Sugawara, Yen et al. 1993). En présence de T3, le taux d'homodimère TR/TR tend à diminuer alors que l'hétérodimère TR/RXR forme un complexe stable et se fixe sur le TRE régulant ainsi la transcription (Yen, Sugawara et al. 1992) (figure 1.6).

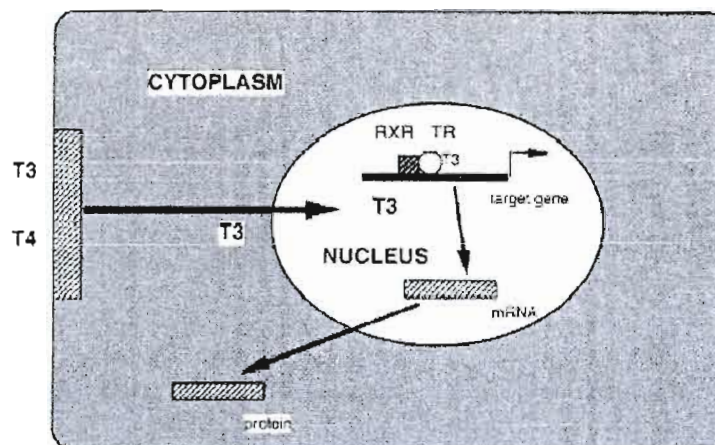


Figure 1.6: Modèle général d'action des hormones thyroïdiennes (Yen 2001).

Les TRE sont formés de séquences consensus et sont localisés dans la majorité des cas en amont du promoteur minimal mais peuvent parfois être situés en 3' de la séquence codante (Bigler et Eisenman 1995). En comparant différents TREs, une demi séquence consensuelle hexamérique a été définie 5'-(G/A)GGT(C/G)A-3'. Cette séquence peut s'organiser en palindrome (TREpal), en répétition directe (DRs) ou encore en palindrome inversé (IPs). Ces demi-séquences peuvent être séparées respectivement par 0, 4 ou 6 nucléotides (figure 1.7). L'hétérodimère TR/RXR se fixe majoritairement sur des TRE organisés en DR4 (Andersson, Nordstrom et al. 1992; Kurokawa, Yu et al. 1993).

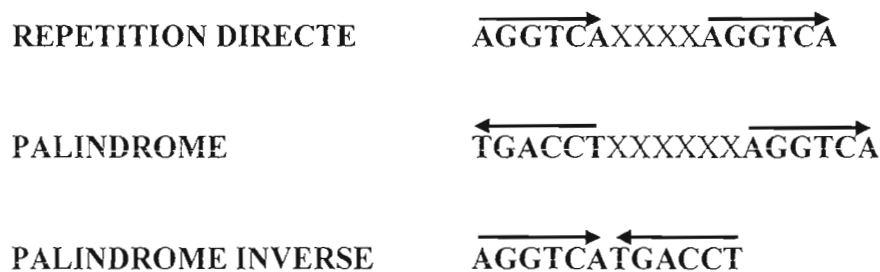


Figure 1.7: Organisation des différents TREs (Yen 2001)

1.3.1.1.3 Les récepteurs aux hormones thyroïdiennes.

Les TRs sont des récepteurs nucléaires qui appartiennent à la super famille des récepteurs incluant les hormones stéroïdiennes, la vitamine D et l'acide rétinoïque. Il existe 2 gènes différents qui vont coder pour 2 isoformes distinctes, TR α et TR β . Ces gènes sont localisés respectivement sur les chromosomes humains 17 et 3 (Lazar 1993). Ces isoformes existent chez différentes espèces, comme chez les amphibiens, le poulet et la souris (Lazar 1993). De plus, il existe un mécanisme d'épissage alternatif, ce qui aboutit à une hétérogénéité encore plus importante des TRs. Selon le type cellulaire, 5 différentes formes majeures de récepteurs vont pouvoir être synthétisées: TR α 1, TR α 2, TR β 1, TR β 2, TR β 3. Les récepteurs TR α 1, TR β 1, TR β 2, TR β 3 diffèrent en taille et dans la séquence d'acides aminés en N-terminal alors que TR α 2 diffère en C-terminal. Ce dernier ne peut fixer la T3 et son rôle est encore méconnu (Flamant et Samarut 2003) (figure 1.8). L'ARNm TR α 1 est hautement exprimé dans le muscle squelettique, dans le tissu adipeux brun, alors que l'ARNm TR β 1 est plutôt exprimé dans le cerveau, dans le foie et au niveau du rein (Hodin, Lazar et al. 1990). L'ARNm TR β 2 et sa protéine ont une expression tissulaire très spécifique. Il est produit au niveau de la glande pituitaire antérieure, et dans des aires spécifiques de l'hypothalamus (Cook, Kakucska et al. 1992).

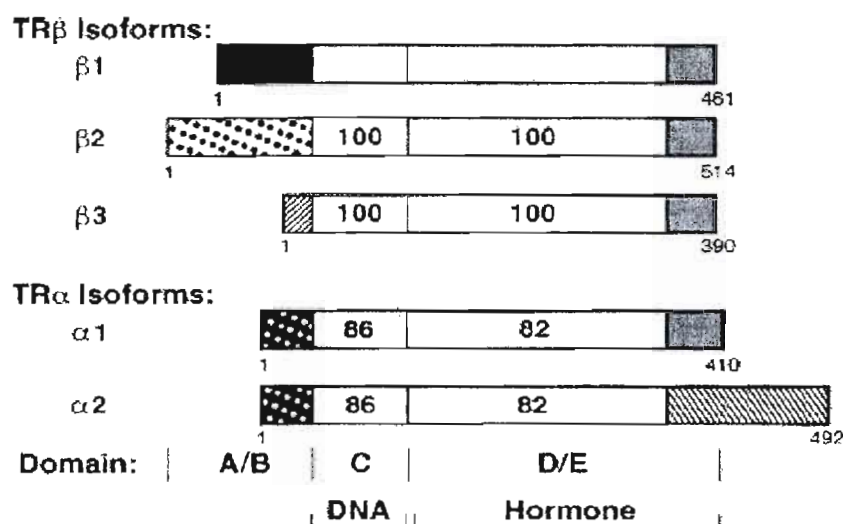


Figure 1.8: Comparaison des différentes isoformes des récepteurs aux hormones thyroïdiennes (Yen 2001)

Les TRs ont la même organisation structurale qui est retrouvée chez l'ensemble des récepteurs nucléaires (Lazar 1993). On distingue 4 domaines : un domaine amino-terminal A/B, un domaine central de fixation à l'ADN contenant 2 motifs en doigt de zinc (*DNA Binding Domain*, DBD), une zone charnière contenant le signal de localisation nucléaire et un domaine C terminal de fixation au ligand (*Ligand Binding Domain*, LBD) (figure 1.8 et 1.9).

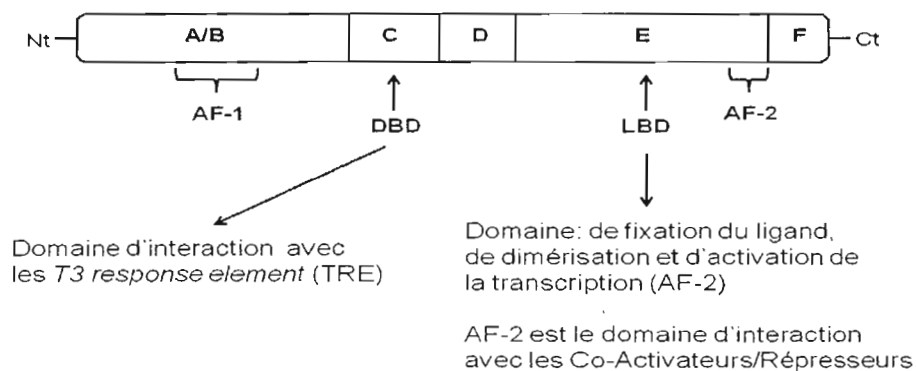


Figure 1.9: Structure générale des récepteurs nucléaires

(Modifié de Yen 2001 par A.Radenne)

Le domaine de fixation à l'ADN est situé dans la région centrale du TR et est composé de 2 motifs en doigt de zinc. A l'intérieur du premier doigt de zinc, on trouve une « boîte P » qui joue un rôle critique dans la reconnaissance du TRE (Nelson, Hendy et al. 1995) (figure 1.10). Les TRs vont se fixer majoritairement au niveau du TRE organisé en DR4. L'hétérodimérisation du TR avec le RXR est essentielle et permet de stabiliser la fixation du complexe au niveau du TRE (Kurokawa, Yu et al. 1993).

Le LBD permet la fixation de l'hormone thyroïdienne mais intervient également dans les mécanismes de dimérisation, de transactivation et de répression en absence du ligand (Yen 2001). Cette région forme une poche hydrophobe où va venir se fixer les hormones thyroïdiennes.

Le domaine amino-terminal (A/B) est la région la moins conservée et son rôle n'est pas bien connu. Il interviendrait dans la transactivation de la transcription mais cette théorie reste controversée (Thompson et Evans 1989).

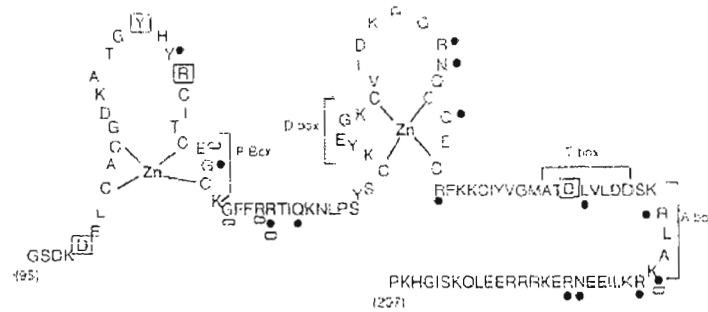


Figure 1.10: Représentation schématique du domaine en doigt de zinc localisé sur le TR β humain (Yen 2001)

1.3.1.1.4 Modulation du mécanisme d'action des TRs

De nombreuses protéines nucléaires vont pouvoir interagir avec le TR et moduler la régulation de la transcription des gènes cibles. Ces protéines vont former des complexes et vont réguler le niveau d'acétylation des histones ou les interactions avec la machinerie transcriptionnelle de base. On peut distinguer les co-répresseurs qui vont exercer une répression basale et les co-activateurs qui vont activer la transcription.

Contrairement aux récepteurs des hormones stéroïdiennes qui sont inactifs en absence de ligand, en absence de T3, les TRs peuvent se fixer sur les TREs et moduler la transcription des gènes. Les TRs sans ligand vont diminuer la transcription basale des gènes positivement régulés par la T3 (Brent, Dunn et al. 1989). Il a été mis en évidence que le TR sans ligand était capable d'interagir avec TFIIB, un élément clef de la machinerie transcriptionnelle et donc interférait avec la formation d'un complexe de préinitiation de la transcription (Baniahmad, Ha et al. 1993). Il est important de noter que certains gènes sont régulés négativement en présence de T3 et qu'en absence de T3, le complexe TR/RXR induirait une augmentation de la transcription (Yen 2001).

Plusieurs co-répresseurs ont déjà été isolés ; le co-répresseur NCor (*nuclear co-repressor*) (Horlein, Naar et al. 1995) qui est capable d'interagir avec TFIIB et le co-répresseur SMRT (*Silencing mediator of RAR and TR*). Ces 2 protéines sont capables de former des complexes avec d'autres co-répresseurs comme sin1 ou avec des histones desacétylases (HDACs) et jouer un rôle clef dans la répression de la transcription. Les HDAC sont des enzymes qui vont enlever les groupements acétyles situés sur les résidus lysines des histones, ce qui va bloquer l'accès des facteurs de transcription au niveau de l'ADN est donc inhiber la transcription. (Hu et Lazar 1999) (figure 1.11).

Lors de la fixation du ligand, il se produit un changement conformationnel, ce qui entraîne la dissociation des co-répresseurs et permet la fixation des co-activateurs. Ces co-activateurs en association avec diverses protéines adaptatrices vont former un complexe permettant de mettre en contact la machinerie transcriptionnelle avec l'hétérodimère TR/RXR. Un des co-activateurs bien caractérisé est la protéine p160/SRC1 (*Steroid Receptor Co-activator*). Cette protéine possède une activité histone acétyltransférase (HAT) intrinsèque et est également impliquée dans le recrutement de différentes HAT et d'histones méthyltransférases. Il est important de noter que SRC-1 peut être phosphorylé par les MAPK et donc peut être régulé par des effecteurs comme des hormones se fixant sur des récepteurs membranaires (Rowan, Garrison et al. 2000). Suite à cette phosphorylation, SRC-1 va recruter le complexe p300/CBP (*CREB Binding Protein*) qui va lui-même recruter le complexe PCAF (*p300/CBP Associated Factor*). Ces protéines servent d'adaptateurs aux récepteurs nucléaires pour la machinerie transcriptionnelle et possèdent une activité HAT (ce qui permet le remodelage de l'ADN) (Bassett, Harvey et al. 2003). Il existe d'autres protéines activatrices telles que les protéines TRAPs (*TR associated proteins*) et les DRIPs (*Vitamin D receptor interacting proteins*). Ces protéines vont permettre la fixation et la stabilisation de l'ARN polymérase II. L'existence de 2 groupes différents de protéines co-activatrices suggère que le TR régule l'activation de la transcription en 2 étapes. Dans un premier temps, il y a remodelage de l'ADN

avec la fixation du complexe p160/SRC1, suivi de la fixation des protéines TRAP/DRIP qui vont moduler la transcription des gènes (Bassett, Harvey et al. 2003) (figure 1.11).

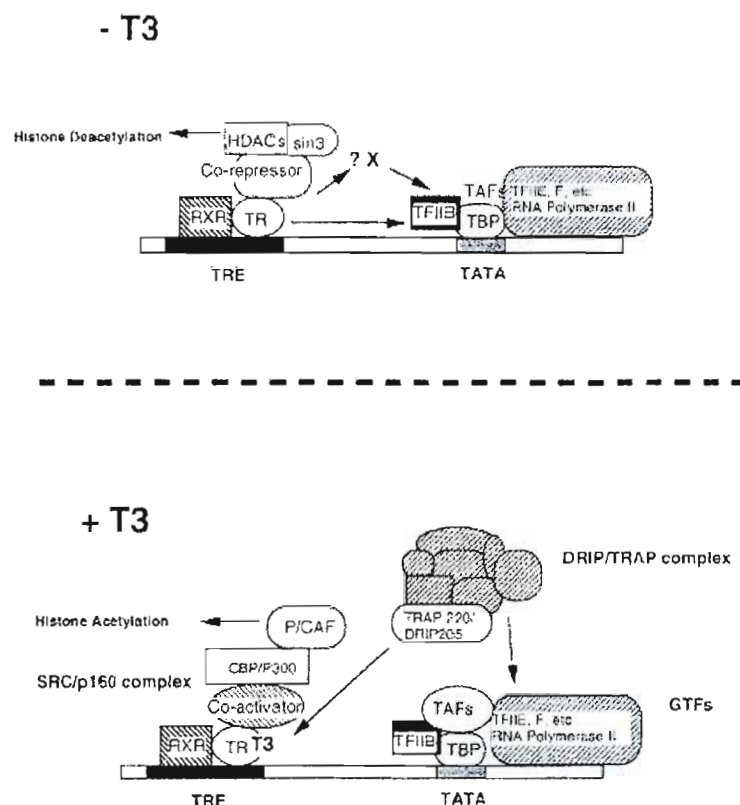


Figure 1.11: Modèle moléculaire de la répression basale en absence de T3 et de l'activation de la transcription en présence de T3 (Yen 2001)

1.3.1.1.5 Modifications post-traductionnelles des TRs

Différents groupes de recherche ont montré que des modifications post-traductionnelles des TRs telles que la phosphorylation (Jones, Brubaker et al. 1994) ou encore l'acétylation (Fu, Rao et al. 2003) peuvent moduler la transcription des gènes régulés par les THs.

L'augmentation du niveau de phosphorylation de la cellule par des inhibiteurs de phosphatase accroît l'action induite par la T3 en activant la transcription de divers

gènes cibles (Swierczynski, Mitchell et al. 1991; Lin, Ashizawa et al. 1992; Jones, Brubaker et al. 1994). Le TR, le RXR ou encore les co-activateurs pourraient être des cibles potentielles de phosphorylation. La voie de signalisation cellulaire des MAPK semble être impliquée dans ces modifications posttraductionnelles. Davis et son équipe ont montré que le TR β 1 est capable de s'associer avec ERK1/2, ce qui aboutit à la phosphorylation du récepteur (Davis, Shih et al. 2000). La phosphorylation du TR favoriserait son hétérodimérisation avec le RXR et donc induirait l'augmentation de la fixation du complexe TR/RXR au niveau du TRE (Bhat, Ashizawa et al. 1994). Le co-activateur SRC-1 est également une cible potentielle de phosphorylation par ERK1/2 (Rowan, Garrison et al. 2000) et peut donc aussi moduler l'activation des récepteurs nucléaires. De plus, la phosphorylation du récepteur TR α 1 du rat semble être impliquée dans la localisation et la rétention du récepteur dans le compartiment nucléaire (Nicoll, Gwinn et al. 2003), ce qui favoriserait une induction de la transcription des gènes cibles. L'ensemble de ces résultats laisse suggérer que la phosphorylation pourrait jouer un rôle important dans la régulation des gènes par la T3 mais par un mécanisme encore méconnus.

Les récepteurs nucléaires et notamment les TRs sont aussi des cibles potentielles d'acétylation (Fu, Rao et al. 2004; Fu, Wang et al. 2004; Lin, Hopkins et al. 2005). La protéine CBP/p300 qui possède une activité HAT intrinsèque semble être directement impliquée dans ce mécanisme d'acétylation (Wang, Fu et al. 2001; Lin, Hopkins et al. 2005). L'acétylation des récepteurs nucléaires induit une augmentation de l'activité transcriptionnelle en favorisant le libération des co-répresseurs et la fixation des co-activateurs (Fu, Rao et al. 2003). La voie MAPK semble aussi être impliquée dans la modulation de ce mécanisme d'acétylation (Lin, Hopkins et al. 2005).

1.3.1.1.6 Action non génomique des THs

Il apparaît de plus en plus évident que les hormones thyroïdiennes pourraient agir *via* un mécanisme d'action différent appelé mécanisme d'action non génomique (Bassett, Harvey et al. 2003; Losel, Falkenstein et al. 2003) (figure 1.12). Comme préalablement décrit, les THs peuvent agir directement au niveau des gènes *via* la fixation d'un complexe hormone/récepteur au niveau d'un TRE (action génomique). Cependant, elles peuvent également agir *via* l'activation de différentes cascades de signalisation intracellulaire telle que la voie PI3-Kinase/Akt et la voie MAPK (Davis, Leonard et al. 2008). L'équipe de Cao a mis en évidence, dans des cellules fibroblastiques humaines, que la T3 était capable d'activer la voie PI3-Kinase/Akt-PKB/mTor/p70^{S6K} via une interaction directe dans le cytosol entre le TR β 1 et la sous unité régulatrice de PI3kinase (p85 α). Ceci induirait une augmentation de la transcription du gène de la calcineurine (ZAKI-4 α) (Cao, Kambe et al. 2005). Dans des cellules endothéliales vasculaires aortiques, la T3 est aussi capable d'activer la voie PI3-Kinase/Akt via également une interaction directe entre le TR α 1 et la sous unité p85 α de PI3-Kinase. L'activation de cette voie induit l'activation de eNOS induisant un effet vasodilatateur et neuroprotecteur au niveau cardiovasculaire. L'activation de la voie PI3-Kinase/Akt par la T3 ne semble pas induire une modulation de la transcription du gène eNOS mais module l'activité de eNOS au niveau post-traductionnel via un mécanisme de phosphorylation (Hiroi, Kim et al. 2006). De plus, l'équipe de Davis a récemment mis en évidence que la thyroxine (T4) était capable de se fixer sur un récepteur membranaire aux intégrines (Lin, Davis et al. 1999; Davis, Davis et al. 2005), ce qui induit l'activation de PKC, Ras, Raf1, MEK et de ERK. L'activation de ces kinases entraîne la translocation dans le noyau de ERK (Davis, Shih et al. 2000; Shih, Lin et al. 2001) et subséquemment la phosphorylation du TR. Il est important de noter que le TR (Davis, Shih et al. 2000), le RXR (Torra, Ismaili et al. 2008) ou encore les co-activateurs comme SRC-1 (Rowan, Garrison et al. 2000) sont des cibles potentielles de phosphorylation par ces

kinases et sont impliqués dans la modulation de la transcription des gènes régulés par la T3.

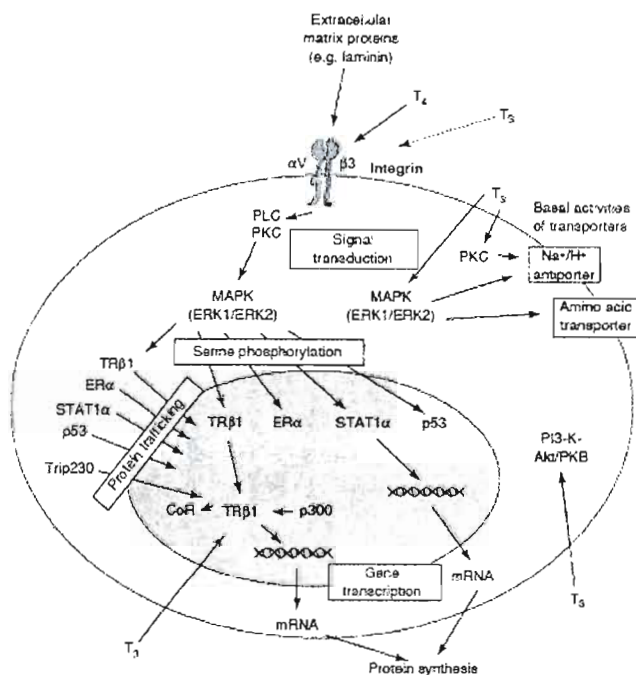


Figure 1.12: Schéma récapitulatif du mécanisme d'action génomique et non génomique des THs (Davis, Davis et al. 2005)

1.3.1.1.7 Le TRE sur le promoteur FAS

Le mécanisme de régulation de la FAS par la T3 n'a pas encore été bien caractérisé. Cependant, un site consensus de fixation à la T3 (TRE) a été localisé sur le promoteur FAS de différentes espèces grâce à des analyses informatiques (Wang, Jones Voy et al. 2004). Ce TRE a été localisé entre -771 pb et -598 pb chez l'humain, la souris, le rat et le poulet. Cet élément est organisé en séquence directe séparée par 4 nucléotides (DR4) et est fortement conservé entre ces différentes espèces (Wang, Jones Voy et al. 2004). Ces analyses ont permis à C. Martel, étudiante à la maîtrise

dans le laboratoire du professeur C. Mounier, de localiser un TRE sur le promoteur FAS de l'oie entre -902 et -577 pb.

Plusieurs TREs présents sur le promoteur aviaire de l'enzyme malique ont déjà été bien caractérisés. L'enzyme malique est une enzyme lipogénique régulée de façon similaire que la FAS (Wilson, Back et al. 1986; Swierczynski, Mitchell et al. 1991). En présence de T3, ces TRE organisés en DR4 fixent l'hétérodimère TR/RXR ce qui induit une augmentation de la transcription (Thurmond et Goodridge 1998). Ces résultats laissent donc suggérer que la T3 induit la transcription de la FAS via la fixation d'un complexe hormone/récepteur sur un TRE localisé sur le promoteur FAS.

1.3.1.2 Régulation de la FAS par l'insuline

Le mécanisme de régulation transcriptionnelle de la FAS par l'insuline a déjà été bien caractérisé. L'insuline agit en se fixant sur son récepteur membranaire (IR : *Insulin receptor*) localisé à la surface des cellules. La fixation de l'hormone sur l'IR induit l'activation de l'activité tyrosine kinase du récepteur, ce qui aboutit à une autophosphorylation puis à une transphosphorylation de l'IR sur des résidus tyrosines. Les résidus tyrosines phosphorylés de l'IR vont permettre le recrutement puis la phosphorylation des protéines adaptatrices telles que les IRS, Gab1 ou CAP, ce qui aboutit en aval à l'activation de différentes voies de signalisation intracellulaire. (Nakae et Accili 1999). La voie PI3-kinase/Akt a déjà été bien caractérisée : la phosphorylation des IRS induit le recrutement de la sous-unité p85 (unité régulatrice) de la PI3-kinase qui par la suite va recruter la sous unité p110. L'activation de PI3-kinase induit la transformation du PIP2 en PIP3 au niveau membranaire aboutissant à la phosphorylation de PDK1. L'activation de PDK1 va entraîner en aval la phosphorylation de Akt, kinase capable de moduler la transcription en phosphorylant différents facteurs de transcription. La voie des MAPK (*mitogen activated protein kinase*) constitue aussi l'une des principales voies de signalisation activée par

l'insuline. Après activation des récepteurs à l'insuline, cette voie implique par l'intermédiaire de protéines adaptatrices l'activation de la protéine Ras. Cette protéine est à l'origine d'une cascade de phosphorylation impliquant Raf (MAP kinase kinase kinase), MEK (MAP kinase kinase) et ERK (MAP kinase). Cette dernière, transloquée dans le noyau de la cellule, phosphoryle alors des facteurs de transcription modulant ainsi la transcription (Avruch 1998).

L'insuline régule la FAS en modifiant la fixation de plusieurs facteurs de transcription au niveau d'une unité de réponse à l'insuline localisée sur le promoteur. Cette régulation implique spécifiquement l'activation de la voie PI3-kinase/Akt (Wang et Sul 1998).

Le premier IRE (Element de réponse à l'insuline) localisé à - 65 pb sur le promoteur de la FAS est une E-box qui fixe les facteurs de transcription ubiquitaires USF-1 et USF-2 (*Upstream Stimulatory Factor*) (Moustaid, Beyer et al. 1994; Wang et Sul 1995). Deux sites de fixation des facteurs SREBP-1c ont été localisés sur le promoteur FAS : le premier SRE (*Sterol response element*) est localisé entre -150 et -141 pb (Latasa, Griffin et al. 2003), le second est plus atypique, il se situe à -65 pb et entoure la E-box (Kim, Sarraf et al. 1998). De plus, l'insuline peut également augmenter la transcription de la FAS en augmentant la synthèse de la protéine SREBP-1c et cela par un mécanisme transcriptionnel (Shimomura, Bashmakov et al. 1999). Les protéines SREBPs sont des facteurs de transcription regroupant 3 isoformes (SREBP-1a, SREBP-1c, SREBP-2). SREBP-1c est l'isoforme qui régule principalement les gènes impliqués dans la synthèse des lipides (Eberle, Hegarty et al. 2004). Les SREBPs sont synthétisés sous forme d'un précurseur associé à des protéines SCAP (*SREBP Cleaving-activating proteins*) au niveau du réticulum endoplasmique (Nohturfft, Brown et al. 1998). Le niveau du facteur de transcription SREBP mature et transcriptionnellement actif est donc déterminé par le niveau de synthèse mais également par le clivage protéolytique du précurseur. L'insuline augmente la transcription du gène SREBP-1c dans le foie (Kim, Sarraf et al. 1998)

via l'activation de la voie de signalisation PI3-kinase et Akt (Azzout-Marniche, Becard et al. 2000).

Il a également été mis en évidence en réponse à l'insuline un site de fixation pour le facteur de transcription nucléaire NF- κ B. Ce facteur stimule la transcription de nombreux gènes en se fixant sur un motif CCAAT. Il existe un dernier site de régulation par l'insuline. Il fixe le facteur Sp1 qui est un facteur de transcription ubiquitaire ciblant une région riche en GC (Mounier et Posner 2006).

1.3.2 Régulation nutritionnelle de la FAS

1.3.2.1 Régulation de la FAS par le glucose

Une alimentation riche en sucre à la suite d'une période de diète induit une augmentation importante du niveau de la protéine FAS (Back, Goldman et al. 1986). Cette régulation a aussi lieu au niveau transcriptionnel. Il a été mis en évidence dans des cellules HepG2 (cellules issue d'un hépatocarcinome humain), que le glucose induit une augmentation de l'expression de la FAS (Semenkovich, Coleman et al. 1993). Cette régulation de la FAS par le glucose s'effectue via la fixation du facteur de transcription ChREBP (Carbohydrate Responsive Element Binding Protein) (Uyeda, Yamashita et al. 2002; Yamashita, Takenoshita et al. 2001; Ma, Robinson et al. 2006) sur son élément de réponse localisé sur le promoteur FAS. De plus, il est à noter qu'une alimentation riche en sucre stimule aussi la production d'insuline par les cellules β du pancréas. L'insuline est bien connue pour réguler la FAS via la fixation de différents facteurs de transcription, comme notamment les SREBP (Latasa, Griffin et al. 2003) sur des IREs localisés sur le promoteur FAS. Il est donc relativement difficile de différencier les effets activateurs induits par l'augmentation du taux de sucre circulant ou par la production de l'insuline (Uyeda, Yamashita et al. 2002). Le glucose est également capable de réguler la FAS au niveau post-transcriptionnel, soit

en régulant la stabilité des ARNm FAS (Li, Chua et al. 1998; Semenkovich, Coleman et al. 1993).

1.3.2.2 Régulation de la FAS par les PUFAs

Les acides gras poly insaturés diminuent la transcription de la FAS au niveau hépatique (Blake et Clarke 1990), alors que dans le tissu adipeux, les PUFAs ont peu d'effet (Sul et Wang 1998). Le mécanisme moléculaire d'action des PUFAs n'est pas encore bien caractérisé. Il a clairement été mis en évidence que les PUFAs peuvent diminuer l'expression de la FAS via la diminution du facteur de transcription SREBP-1. (Moon, Latasa et al. 2002). Les PUFAs pourraient également agir en inhibant la fixation de la T3 sur son récepteur nucléaire, ce qui induirait une diminution de la transcription (Inoue, Yamamoto et al. 1989). Enfin, la transcription de la FAS pourrait être modulée par les PUFAs via les facteurs de transcription PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor) (Bocos, Gottlicher et al. 1995).

1.3.2.3 Régulation de la FAS par les MCFAs

Il a déjà été mis en évidence que les acides gras saturés de 6 ou 8 carbones étaient capables d'inhiber l'effet synergique de la T3 et de l'insuline au niveau de la transcription et de l'activité de la FAS (Roncero et Goodridge 1992) (Thurmond, Baillie et al. 1998). Cependant le mécanisme d'action des MCFAs sur la transcription de la FAS reste encore à être élucidé. Cette régulation semble avoir lieu au niveau du TRE (Thurmond, Baillie et al. 1998). Cependant, les MCFAs ne semblent pas moduler la fixation de l'hormone sur son récepteur, ni du TR sur le TRE (Thurmond, Baillie et al. 1998). Différentes hypothèses peuvent être envisageables : (i) les MCFAs ou leurs métabolites pourraient moduler la maturation de la protéine SREBP-1 entraînant une inhibition de la transcription induite par la T3 et l'insuline (Zhang, Yin et al. 2003), les MCFAs pourraient également agir directement *via* leur fixation

sur un récepteur de type GPCR (Brown, Jupe et al. 2005) et activer différentes voies de signalisation qui pourraient moduler le niveau de phosphorylation ou d'acétylation du complexe TR/RXR ou encore des différents co-activateurs ou co-represseurs (Yen 2001).

L'objectif de ce travail de maîtrise est de mettre en évidence les mécanismes moléculaires par lesquels la T3 et l'insuline régule la transcription de la FAS.

CHAPITRE II

ARTICLE SCIENTIFIQUE

**HEPATIC REGULATION OF FATTY ACID SYNTHASE BY INSULIN AND
T3: EVIDENCE FOR T3 GENOMIC AND NON-GENOMIC ACTIONS.**

Abbreviation title: Insulin and T3 regulation of FAS gene expression

*Anne Radenne, Murielle Akpa, Caroline Martel, Sabine Sawadogo, Daniel Mauvoisin
and Catherine Mounier*.*

Département des Sciences Biologiques, Centre de recherche BioMed, Université du
Québec, Montréal, Québec, Canada, H3C 3P8.

Correspondent footnote. *To whom correspondence should be addressed:

Département des Sciences Biologiques, Centre de recherche BioMed, Université du
Québec. C.P. 8888, Succursale Centre-ville, Montréal, Canada, H3C 3P8. Tel. 1-514-
987-3000, Ext 8912; Fax: 1-514-987-4647; E-mail: mounier.catherine@uqam.ca

2.1 Abstract

Fatty acid synthase (FAS) is a key enzyme of hepatic lipogenesis responsible for the synthesis of long chain saturated fatty acids. This enzyme is mainly regulated at the transcriptional level by nutrients and hormones. In particular, glucose, insulin and T3 increase FAS activity whereas glucagon, saturated and polyunsaturated fatty acids decrease it.

In the present study, we show that, in liver, T3 and insulin were able to activate FAS enzymatic activity, mRNA expression and gene transcription. We have localized the T3 response element (TRE) that mediates the T3 genomic effect, on the FAS promoter between -741 and -696 bp that mediates the T3 genomic effect. We show that both T3 and insulin regulate FAS transcription via this sequence. The TRE binds a TR/RXR heterodimer, even in the absence of hormone and this binding is increased in response to T3 and/or insulin treatment.

The use of H7, a serine/threonine kinase inhibitor, reveals that a phosphorylation mechanism is implicated in the transcriptional regulation of FAS in response to both hormones. Specifically, we show that T3 is able to modulate FAS transcription *via* a non-genomic action targeting the TRE through the activation of a PI3-kinase-Erk1/2-MAPK dependent pathway. Insulin also targets the TRE sequence, probably *via* the activation of two parallel pathways: Ras/Erk1/2 MAPK and PI3-kinase/Akt. Finally, our data suggest that the non-genomic actions of T3 and insulin are probably common to several TREs, as we observed similar effects on a classical DR4 consensus sequence.

Key words: Fatty acid synthase, triiodothyronine, insulin, TRE, PI3-kinase, Erk1/2 MAPK.

2.2 Introduction

Lipogenesis converts dietary carbohydrates to fatty acids primarily in liver (28). Insulin and triiodothyronine (T3) are involved in mediating the effects of diet on lipogenesis *in vivo* (34). Hepatic lipogenesis is increased in hyperthyroid states or in response to T3 injection (10, 15, 19, 24, 25, 28, 61, 70, 75, 82) as well as in hyperinsulinemic subjects (79). *In vivo*, these two hormones are also involved in the long-term regulation of lipogenic enzymes activities such as fatty acid synthase (37).

Fatty acid synthase (FAS) (EC.2.3.1.85) is a key enzyme in hepatic lipogenesis. In presence of NADPH, this multifunctional enzyme catalyses the conversion of acetyl-CoA and malonyl-CoA into long chain saturated fatty acids such as palmitate and stearate (92). The *de novo* synthesis of fatty acids in human and chicken mainly takes place in the liver (30, 58), whereas in rodents the adipose tissue is also lipogenic (30). In vertebrates, FAS is a homodimer made of two identical peptide chains of about 260kD (84, 91), located in the cytoplasm of the cell (31). FAS is encoded by a unique gene that generates only one mRNA in mouse (72) and two in chicken and rat, as a result of alternative splicing (3). In the liver, the activity of FAS, as most lipogenic enzymes (96), is regulated through nutrients and hormones. Starvation causes decrease in the activity of the enzyme, and refeeding restores it (3, 66). A similar effect of refeeding is also observed on the mRNA expression level and stability, as well as on the transcription (3, 41, 48, 52, 65). It was also shown that insulin (73) and T3 (83, 96) increase the FAS mRNA expression level, whereas glucagon (50, 73, 81), medium chain fatty acids (MCFA) (76) and polyunsaturated fatty acids (PUFA) decrease it (9, 17, 43, 64).

Insulin increases FAS transcription by modifying the binding of various transcription factors on the insulin response element (IRE) located on the promoter (73). The effect of insulin is mediated by the activation of the PI3-kinase/Akt pathway (93). The first IRE characterized is an E-box, that binds the ubiquitous transcription factors USF1 and USF2 (Upstream Stimulatory Factors), located at -

65bp on the FAS promoter (68, 94). Insulin also increases transcription of FAS by inducing the binding of SREBP-1c to two different SREs (Sterol Regulatory Element), one located around -150bp (51) and the other at -65bp (51). Finally, insulin also regulates FAS transcription by increasing the binding of NF-Y and Sp1 to the -103 bp to -53bp region (63).

Various studies from the A.G. Goodridge's laboratory showed that T3 is able to potentiate the effect of insulin on FAS transcription through an unknown mechanism (83, 96). T3 is known to regulate gene transcription via the binding of hormone/receptor complexes to T3 response elements (TRE) located on the promoter of a variety of genes (97). The TREs are located, for the most part, upstream of the minimal promoter, but can sometimes be located on the 3' end of the coding sequence (8). A consensual hexameric sequence, (G/A)GGT(C/G)A, was defined. This sequence can be a palindrome (TREpal), a direct repeat (DRs) or an inverted palindrome (IPs) (32). These TREs bind the T3 receptors (TR) belonging to the nuclear receptor super-family (53). The latter can form homodimers or interact with other nuclear receptors, such as RXR (retinoid X receptor) to form heterodimers (11, 27). The heterodimers bind preferentially to DRs separated by four nucleotides (DR4) (74). This increases the transcriptional activity in response to T3, in a more efficient manner than the TR/TR homodimers (39, 47). In regard to the FAS gene, the sequence alignment of different species (mouse, rat and chicken) suggests the presence of a DR4-type TRE on the promoter (95).

Previous studies suggest that a general increase in the phosphorylation state of the cell would maximize the T3 action by activating the transcription of target genes (42, 60, 88). The TR and RXR receptors, as well as different co-activators, can be targets of these phosphorylation events. In particular, TR can be phosphorylated in the cytosol (33) by casein kinase II but also in the nucleus (85). This phosphorylation would initiate TR heterodimerization with RXR (7), or could also protect it from degradation, which in turn would increase transcription (89). It has also been shown

that SRC1, a TR coactivator, can be phosphorylated by MAP-kinase through the activation of membrane bound receptors (77).

It becomes more apparent that thyroid hormones (THs) regulate transcription *via* a non-genomic mechanism (5, 62), by activating different intracellular signaling cascades. Cao and collaborators showed that in human fibroblasts, T3 was able to activate the PI3-kinase/PKB/mToR/p70^{S6K} pathway *via* a direct cytosolic interaction between TR and the PI3-kinase regulatory subunit, p85 α (14). Moreover, previous studies have demonstrated that thyroid hormone is able to bind an integrin α (V) β (3) cell surface receptor leading to the activation of a PKC α (1, 6, 21, 59). Subsequently, Erk1/2 MAPK is activated and translocated into the nucleus (22, 80) where it can phosphorylate the TR (22, 80).

In the present study, we have shown that at the hepatic level, insulin and T3 act synergistically to stimulate FAS activity. The effect of T3 on FAS is mainly transcriptional and mediated by the binding of a TR/RXR heterodimer on a DR4-type TRE. On top of that, our study reveals that the T3 action on the TRE also involved a non-genomic action through the activation of a PI3-kinase and Erk1/2 MAPK dependent signaling pathway. Finally, our study also suggests that insulin is able to modulate the transcriptional activity of the TRE either through the activation of a PI3-kinase/Akt and/or a Ras/Raf-Erk1/2MAPK signaling pathway.

2.3 Materials and methods

2.3.1 Materials

The restriction enzymes, the T4 DNA ligase and the T4 polynucleotide kinase were obtained from New England Biolabs (Pickering, CA). The Taq polymerase was acquired from Perkin Elmer (Wellesley, MA). Eggs from white Leghorn chickens were purchased from Couvoir Simentin (Mirabel, Quebec). HepG2 cells were purchased from ATCC (Manassas, VA). Minimum Essential Medium (MEM), Waymouth medium, 3,5,3-L-triiodothyronine, insulin, H7 and genistein were obtained from Sigma. LY294002, PD98059 and U0126 inhibitors were purchased from Calbiochem (EMD Biosciences, San Diego, CA). [γ - 32 P]-ATP was purchased from Perkin Elmer (Wellesley, MA). Fugene HD transfecting agent, CAT-ELISA kit, Collagenase H and Klenow enzyme were obtained from Roche Diagnostic (Laval, Quebec). Fetal bovine serum was purchased from Cansera (Etobicoke, Ontario). Antibodies (Akt, anti-phospho-Akt (*Ser273*), p42/44 MAPK, anti-phospho-p42/44 MAPK (*Thr 202/204*)) were acquired from Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA). Anti-TR α 1/Tr β 1 and anti-RXR α / β / γ antibodies were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Unless otherwise stated in the text, all other chemicals were purchased from Sigma.

2.3.2 Plasmid Constructs

The goose fatty acid synthase promoter was graciously provided by Dr. A.G. Goodridge (44). This cosmid contained 46kb of the FAS gene including 12kb downstream of the transcription initiation site. The first 1.6kb of the FAS promoter were cloned into the pJFCAT1 vector, which incorporates the Chloramphenicol acetyl transferase (29) reporter gene. The -902bp to -577bp fragment, containing the FAS TRE, was PCR amplified using specific primers containing HindIII and BamHI restriction sites at their extremities. The amplified fragment was subsequently inserted into the pBLCAT2 vector upstream of the thymidine kinase (88) minimal

promoter and the CAT reporter gene. The synthetic sequence of the classical TRE DR4 (AGCTTAGCTTCAGGTCACAGGAGGTCAGAGAGG) was cloned into the pBLCAT2 vector using the Hind III and Sal I restriction sites.

2.3.3 Cell culture and transfection.

Chick embryo hepatocytes (CEH) were isolated from livers of 19-day-old chick embryos (35) (protocol # 590 approved by the University animal care comity). 2.5×10^6 cells were plated in 35mm tissue dishes and cultured at 40°C under 5% CO₂, in Waymouth medium supplemented with streptomycin (100µg/mL) and penicillin (60µg/mL). After 24h, the medium was removed by aspiration and replaced by medium supplemented with T3 and/or insulin, and incubated for different periods of time as indicated in the figure legends. For the experiment using kinase inhibitors, the CEH were incubated with the hormones after a 30 min pre-incubation period with the various inhibitors (DMSO 0.5%, 5µM genistein, 25µM H7, 50µM PD98059, 50µM LY294002, and 20µM U0126). The human hepatocarcinoma cells (HepG2) were cultured in MEM medium supplemented with streptomycin (100µg/mL), penicillin (60µg/mL), FBS (10%) and glutamine (4mM final). The day before transfection, the cells were plated at 80% confluence (about 6×10^5 cells per well). The cells were then incubated for 24h with 7µL of Eugene HD, 1.5µg of the different DNA constructs tested and 0.5µg of pRSV-β-galactosidase, in absence of serum and antibiotics. The medium was then replaced with one containing antibiotics and serum, and hormones were added as indicated in the figure legends. After 24h of culture, the cells were harvested and the different cellular extracts were prepared.

2.3.4 FAS activity.

FAS activity was measured by tracking the decrease of absorbance at 340nm, which is the result of NADPH disappearance due to the conversion of malonyl-CoA and acetyl-CoA into long chain fatty acids (36). Following hormonal stimulation, 2 to 3 plates of treated cells (about 10×10^6 cells) were harvested in 1X PBS. After a short

centrifugation, the cells were re-suspended in cold homogenization buffer (0.1M KPi, pH 7; 3mM EDTA, pH 7 and 1mM DTT). The cytosolic extracts were prepared through homogenization of the cells with a Dounce homogenizer. The lysates were subsequently centrifuged at 3000 rpm for 15 min at 4°C. The FAS activities was evaluated by mixing, in a Quartz cuvette, 50µL of cell lysate, 0.1M KPi, pH 7; 0.0025mM acetyl-CoA; 0.18mM NADPH; 3mM EDTA and 1mM DTT. The reaction was initialized by adding 0.1mM of malonyl-CoA. The OD at 340nm was then recorded for a 15 min period, at 40°C in a Cary-100 spectrophotometer (Varian, Quebec).

2.3.5 Analysis of mRNA expression level.

Total RNA was extracted from chick embryo hepatocytes as previously described (16). UV-quantified RNA were diluted in DEPC-treated water at a final concentration of 1µg/µl. Reverse transcription (RT) was performed using the Omniscript enzyme kit of Qiagen (Montreal, Quebec) and Oligo-dT (Roche Diagnostics, Quebec) for 1h00 at 37°C, with a 5 min inactivation step at 93°C. qPCRs were then performed using the QuantiTect SYBR Green PCR Kit from Qiagen (Montreal, Quebec) and the LightCycler device (Roche Diagnostics, Quebec). The HPRT-1 gene was used as reference. The relative quantification was then performed using the RelQuant software (Roche Diagnostics, Laval, Canada). For the FAS gene, primers were defined on goose sequences: AGGAAATGAGGCTGCGTTG (sense) and CTGAGTGCTTCACGGTTGATG (antisense) and for the HPRT-1 gene primers were defined on human sequences: ATGACCTCTCAACCTTGACTGG (sense) and GGCCACTTTCACCATCTTTG (antisense).

2.3.6 Analysis of promoter activity.

HepG2 cells were lysed at room temperature in 500 μ L of CAT Elisa lysis buffer (Roche Diagnostics, Laval, Quebec). Protein concentration (12) and β -galactosidase activity (78) were measured by the indicated methods. The CAT activity was evaluated using the CAT-ELISA kit according to the manufacturer's instructions (*Roche Diagnostics*). The results were expressed as CAT activity per milligram of soluble protein, and then normalized for transfection efficiency using the β -galactosidase activity.

2.3.7 Gel electrophoretic mobility shift assay.

HepG2 cells were incubated for 24h in serum free MEM with or without 100mM insulin, 1.6 μ M T3 or both hormones and nuclear extracts were prepared as previously described (2). A 40bp double stranded oligonucleotide corresponding to the TRE sequence of the goose FAS gene (TGCCCTGCCCCGCCGCCCTGTGGTAACCTCGGGACCGCGCT) was labeled with [γ - 32 P]-ATP using the T4 polynucleotide kinase. 5 μ g of nuclear extract were incubated with 2 μ L of binding buffer containing 20,000cpm of 32 P labeled probe, 10ng of poly(dI-dC), 1 μ L of BSA, 4% (v/v) glycerol and 1% (v/v) ficoll. The reaction was then incubated for 15 min at room temperature. For supershift experiments, nuclear extracts were pre-incubated for 15 min at room temperature with 2 μ g of specific antibody or with IgG. The reaction mixtures were then subjected to electrophoresis on a 6% polyacrylamide gel at 150 V in 25mM Tris-HCl, 0.19M glycine, 1mM EDTA. Gels were dried and visualized by autoradiography using the phospho-imager system (Molecular imager FX, Biorad, Mississauga, Canada).

2.3.8 Western blot.

After treatment with the test agents, for the time and the concentration indicated in the figure legends, CEH were rinsed twice with ice-cold phosphate-buffered saline (pH 7.4) and solubilized with lysis buffer (50mM Hepes, pH

7.5, 150mM NaCl, 10mM sodium pyrophosphate, 100mM sodium fluoride, 1.5mM MgCl₂, 1mM EGTA, 200μM sodium orthovanadate, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, tablet of EDTA free complete mini (Roche Diagnostics, Laval, Quebec), 10% glycerol, and 1% Triton X-100). Cell lysates were clarified by centrifugation at 10 000 x g for 20 min at 4 °C, and protein concentrations, in the resulting supernatants, were determined using the Bradford method (12). 20μg of protein from cell lysates were mixed with 4μl of 3x Laemmli sample buffer (2% SDS, 2% β-mercaptoethanol, 10% V/V glycerol and 50mg/ml bromophenol blue in 0.1M Tris-HCl buffer, pH 6.8), heated at 100°C for 5 min, subjected to SDS-PAGE and then transferred to Immobilon-P membranes (*Millipore*) for immunoblotting. Membranes were incubated for 1h in blocking buffer (1X TBS, 0,1% Tween-20: TBST) containing 5% milk, and then overnight at 4°C in TBST/5% BSA with the various antibodies: FAS (1:1000), GAPDH (1:1000), Akt (1:1000), phospho-Akt (1:1000), p42/44 MAPK (1:1000), phospho-p42/44 MAPK (1:1000)). After 3 consecutive washes in 1X TBST, the membranes were incubated in 1X TBST with 5% milk in presence of an anti-rabbit IgG bound to the horseradish peroxidase (1:10000). Signals were revealed using the ECL plus Western blotting detection reagent according to the manufacturer's instructions (GE Healthcare, Baie d'Urfé, Quebec). The appropriate bands were quantified using the α-phospho-imager system (Molecular imager FX, Biorad, Mississauga, Canada).

2.4 Results

2.4.1 Roles of T3 and insulin on FAS enzymatic activity, protein and mRNA levels.

Various studies have already demonstrated that in liver T3 and insulin are able to increase FAS enzymatic activity and mRNA expression (86, 88, 96). Incubation of the human hepatocarcinoma cells (HepG2) with 10nM, 100nM or 1.6 μ M T3 for 24h significantly increases the level of the FAS protein expression. Addition of 100nM insulin leads also to a similar level of increase while combination of the two hormones is synergistic (Fig. 2.1A). Most of the subsequent experiments will be performed using 1.6 μ M T3 and 100nM insulin. In CEH, insulin and T3 are able to increase FAS enzymatic activity by about 3 fold (Fig. 2.1B) and in presence of both hormones, an important synergistic effect is also observed, increasing the activity by 14 fold. Similar hormonal effects are observed on mRNA expression level (2.5 fold increase with T3 or insulin, and 10 fold with both hormones, Fig. 2.1C). Taken together, these results suggest that T3 and insulin regulate FAS expression through a pre-translational mechanism.

2.4.2 Effects of insulin and T3 at the transcriptional level

In order to evaluate if the effects of T3 and insulin are the result of a modulation of the FAS promoter's transcriptional activity, we cloned the proximal fragment (around 1.5kb upstream of the cap site, -1450 to +133bp) of the goose FAS promoter upstream of the Chloramphenicol Acetyl Transferase (29) reporter gene. Subsequently, this DNA construct (TRE-TK-CAT) was transiently transfected into HepG2 cells, and the CAT activity was evaluated in presence or not of the two hormones. As depicted in Fig. 2.2A, having T3 in the medium increases the transcription of the FAS gene about 3 fold. This suggests that a T3 response element (TRE) is present in the first 1450bp of the FAS promoter. By 5' serial deletions, we localized the TRE between -902 and -577bp (*data not shown*). This sequence,

containing the TRE, was then inserted upstream of the minimal promoter of thymidine kinase and the CAT reporter gene, and transiently transfected into the cells. When the cells were treated with T3, we observed about a 3 fold increase in CAT activity. Comparing the goose FAS sequence to different species, we were able to accurately localize the TRE between -741 and -696bp (Fig. 2.2B). Astonishingly, insulin was also able to increase FAS transcription (about 1.5 fold) through this TRE, and in presence of both hormones, the transcription increases more than 4 fold (Fig. 2.2A). Interestingly, the same hormonal effects were obtained when cells were transfected with a classical synthetic TRE (DR4-TK-CAT). These results suggest that both T3 and insulin are able to increase (i) FAS transcription through a specific TRE and (ii) the transcriptional activity of a classical DR4 element.

In order to characterize and identify the transcription factors involved in the hormonal response at the promoter level, we carried out electrophoretic mobility shift assay experiments (EMSA). For this, we used a double stranded oligonucleotide encompassing the -741 to -696bp sequence of the goose FAS promoter as a probe (Fig. 2.3A). This ^{32}P -labeled probe was incubated with the nuclear extracts prepared from HepG2 cells, treated or not with T3 and/or insulin. As indicated in Fig. 2.3B, in presence of nuclear extracts, a retarded band is observed in all conditions (even in absence of hormonal treatment), suggesting that nuclear proteins are able to bind this 40bp sequence. Following T3 or insulin treatment, binding of the nuclear proteins is increased (about 1.5 fold compared to untreated cells; Fig. 2.3B). When both hormones were added together, the binding is even stronger (2.5 fold compared to untreated cells; Fig. 2.3B). By adding specific antibodies directed against TR and RXR to the nuclear extracts, we were able to show that the retarded band either disappeared or was substantially decreased. This suggests that a TR/RXR heterodimer is formed on the FAS TRE, even in absence of hormonal stimulation, whereas in the presence of either T3, insulin or both the binding of this heterodimer is increased.

2.4.3 Role of phosphorylation in the regulation of FAS

As previously described, treatments of hepatic cells by T3 and insulin for 24h strongly induce FAS protein expression (Fig. 2.1A) and activity (Fig. 2.1B). However, when insulin is added first in the medium for 10h followed by a T3 treatment for 14h, the level of FAS induction is much weaker (only 2 fold, Fig. 2.4A). This is equivalent to the level of the stimulation observed in presence of a single hormone. But, when T3 is added first for 10h followed by an insulin treatment for 14h, FAS enzymatic activity is increased 6 fold. This may suggest that additional mechanisms are required to fully induce FAS activity.

T3 and insulin can activate specific intracellular signaling pathways leading to various phosphorylation cascades, resulting in the transcriptional modulation of numerous genes (5, 67). For that reason, CEH were incubated with a general inhibitor of either tyrosine kinase (Genistein) or serine/threonine kinase (H7). The effects of these inhibitors were subsequently evaluated on the T3 and insulin-induced FAS enzymatic activity. Genistein does not statistically modified FAS activity (Fig. 2.4B) whereas H7 strongly decreases it and this under all hormonal treatments (Fig. 2.4C). The effect of those inhibitors was subsequently tested on FAS transcription, by transfecting the TRE-TK-CAT construct in HepG2 cells. Similar effects of both Genistein (Fig. 2.4D) and H7 (Fig. 2.4E) were observed on the FAS TRE transcriptional activity. Taken together, our results suggest that phosphorylation mechanisms involving serine/threonine kinases are required to insure optimal effects of T3 and insulin on the regulation of FAS transcription *via* the TRE.

2.4.4 Role of the PI3-kinase and Erk1/2 MAPK pathways in the regulation of FAS in response to T3 and insulin.

It is well known that, in liver, both T3 and insulin were able to activate various cellular signaling pathways, such as the PI3-kinase/Akt and/or Erk1/2-MAPK pathways (21, 67). In order to evaluate the implication of such pathways in the FAS regulation in response to these two hormones, we measured the FAS enzymatic

activity in presence of specific pharmaceutical inhibitors for each pathway. Pre-incubation of T3 and insulin-treated CEH cells with LY290042, a PI3-kinase inhibitor or PD98059, a MEK1/2 inhibitor, strongly decreases FAS enzymatic activity (Fig. 2.5A). The inhibitors have similar or even more pronounced effects on the FAS promoter activity, generated by the TRE-TK-CAT construct transiently transfected in HepG2 cells (Fig. 2.5B). Interestingly, identical results were obtained when HepG2 cells were transiently transfected with the DR4-TK-CAT construct (Fig. 2.5C). Together, these results suggest that PI3-kinase and/or Erk1/2 MAPK are implicated in the transcriptional regulation of gene transcription, in response to T3 and insulin, and this through a TRE (FAS TRE and the classical DR4 element).

In order to clarify the implication of the two kinases in each hormonal effect, we measured the level of phosphorylation of Erk1/2 MAPK and Akt in response to T3 and insulin when submitted to the specific pharmacological inhibitors. As indicated in Fig. 2.6A, T3 increases Erk1 phosphorylation level on threonine 202/204 residues. This effect is observed at both 100nM and 1.6 μ M of T3. As depicted in Fig. 2.6B, the maximal T3 effect is detected at 10min, declining rapidly thereafter. The Erk2 phosphorylation level is not substantially modified by T3. Following an insulin treatment, a maximal phosphorylation of Erk1 is observed at 10min, which is sustained up to 90 min. Similarly to T3, insulin does not modified Erk2 phosphorylation. When the cells are treated with both hormones, the stimulation profile is identical to the one observed with insulin alone.

We then evaluated the level of T3 and insulin-induced Erk1 phosphorylation in presence of the pharmaceutical inhibitors. As depicted in Fig. 2.7A, the T3-induced stimulation is lost with U0126 or PD98059 as well as with LY294002. However, in presence of insulin or with both hormones, only MEK inhibitors, and not LY290042, decrease Erk1 phosphorylation (Fig 2.7B & 2.7C respectively). It is interesting to note that with all hormonal stimulations, ERK1/2 phosphorylation is totally inhibited by U0126, while PD98059 did so only partially (Fig. 2.7B & 2.7C). This is in

agreement with the study which demonstrated that U0126 is 100-fold more potent than PD98059 in inhibiting ERK1/2 phosphorylation (26).

We then evaluated the effects of those hormones on the phosphorylation state of Akt on Ser473 residue (Fig. 2.8). As expected, the presence of insulin increase Akt phosphorylation at both 10 and 30 min, while no phosphorylation was detected with T3. Incubating the cells with both hormones reveals a pattern similar to that observed with insulin alone.

In conclusion, our results suggest that T3 and insulin are able to activate FAS transcription through the TRE. T3 acts on this TRE through a genomic action *via* the direct binding of the TR/RXR heterodimer. It also acts *via* a non genomic action, involving the activation of a PI3-kinase/Erk1/2 MAPK dependent pathway. On the other hand, insulin modulates FAS transcription through the same TRE. However, it happens through the activation of two parallel signaling pathways, *via* a PI3-kinase/Akt dependent pathway and/or a pathway involving Erk1/2 MAPK. Finally, we also showed that the implications of these signaling cascades are not restricted to the FAS promoter, but appear to be a general phenomenon, as the same effects are observed on a classical DR4 element.

2.5 Discussion

In agreement with previously published studies performed in chick embryo hepatocytes (CEH) (83, 96), we showed that T3 and insulin were able to increase FAS enzymatic activity (about 3 fold, Fig. 2.1A) and mRNA expression level (about 2.5 fold, Fig. 2.1C), in both CEH and HepG2 cells. Insulin alone was also identified as a potent FAS activator in mouse models (73). As demonstrated in CEH (83, 96), the presence of the two hormones synergistically stimulate FAS in chicken as well as in human models (Fig. 2.1). It therefore appears that FAS expression is similarly regulated in different species.

Other studies suggest that the hormonal regulation of FAS is principally pre-translational, probably as a result of the transcriptional modulation of gene expression (72, 73, 83). The transcriptional regulation of FAS by insulin has been well characterized. In 3T3-L1 cells, it was shown that insulin increases FAS transcription through the activation of the PI3-kinase/Akt dependent pathway (93). The insulin effect is mediated through the modification of the binding of various transcription factors to insulin response elements located on the FAS promoter (73). An IRE has been identified at -65bp on the rat FAS promoter (68, 94). It is an E-box that binds the ubiquitous transcription factors USF1 and USF2 (Upstream Stimulatory Factors). In addition, insulin also increases mouse FAS gene transcription by inducing the binding of SREBP-1c on two different Sterol Regulatory Element (SRE) located around -150bp (51) and -65bp (46). Finally, insulin regulates FAS transcription through the modulation of the binding of NF-Y and Sp1 on the FAS rat promoter region located between -103 to -53bp (63).

In goose, and probably in other species, we show that insulin also modulates FAS promoter activity by targeting a TRE located between -717 and -701bp, increasing the binding of a TR/RXR heterodimer (Fig. 2.3B). Interestingly, a similar phenomenon was observed with a classical DR4 element suggesting a general effect of insulin on TREs (Fig. 2.2A & 2.5C). The action of insulin on the TRE seems to

involve the activation of two distinct signaling pathways (PI3-kinase/Akt and Ras-Raf-Erk1/2 MAPK). The activation of these two pathways may induce the phosphorylation of TR and/or various co-activators resulting in the increase binding of TR/RXR on the TRE (Fig. 2.3B). However, the exact contribution of these insulin-induced pathways on the FAS TRE remains to be elucidated.

In the present study, we also characterized the mechanism of T3 action on the FAS promoter. We localized a TRE on the goose FAS promoter between -717 and -701bp. This TRE is a direct repeat sequence separated by 4 nucleotides (DR4). It is well conserved among species, suggesting a similar type of regulation (95). Moreover, our results show that in presence of insulin and T3, only a weak synergistic effect on TRE-mediated transcription is observed compared to what is seen at the mRNA level and enzymatic activity. This may indicate that the previously identified insulin response elements located downstream on the TRE are necessary to achieve a full stimulation of FAS activity and expression.

Through mobility shift assays, we showed that a TR/RXR heterodimer binds to the TRE even without hormonal stimulation. Adding T3 and/or insulin increases the heterodimer's binding (Fig.2.3B). Many studies have shown that the TR/RXR heterodimer binds with better affinity to a DR4-type TRE (74). The 4 nucleotide space helps stabilize the TR/RXR complex, leading to increased transactivation (32, 90). The binding of the complex to the TRE, in absence of hormones, could involve the FAS basal repression as previously described for many other genes positively regulated by T3 (98). In this case, the TR/RXR complex would interact with TFIIB (4, 38), interfering with the formation of the transcription pre-initializing complex. This basal repression is also maintained through the association of TFIIB with co-repressors (40, 54). The presence of hormone would lead to a conformational change, inducing the dissociation of co-repressors, and the binding of co-activators, such as the p160/SRC protein (Steroid Receptor Co-activator)(71), the p300/CBP complex (CREB Binding Protein) (49) and PCAF (p300/CBP Associated Factor)(49). The

binding of co-activators on the TR/RXR complex leads to the maximum induction of gene transcription in response to T3.

The classic genomic action of thyroid hormone is well known. Its effect is delayed, only appearing after a few hours of hormonal stimulation. Various studies reported a faster effect of T3, in particular in the control of Ca^{2+} entry or in protein trafficking (20, 23). The authors demonstrated that the hormone could act through a non-genomic action mechanism, also called extra-nuclear action, and involves the activation of various signaling cascades (62). Using various hormonal combinations of T3 and insulin, our present study suggests that phosphorylation mechanisms are also involved in the transcriptional regulation of FAS via the TRE (Fig. 2.4A). This was confirmed by the use of the Ser/Thr kinases inhibitor H7 (Fig. 2.4C and 2.4E). Previous studies have also shown that the use of H8, another protein kinase inhibitor, decreases insulin and T3-induced FAS mRNA level in CEH (88). On the other hand, it was shown in various tissues, that a general increase of the cell's phosphorylation level, through the use of protein phosphatase inhibitor, induces an increase in the transcription of T3-regulated genes (42, 60). A similar mechanism was described for steroid hormones.

In hepatic cells, we showed that T3 is able to activate the Erk1/2 MAPK pathway through the activation of PI3-kinase (Fig. 2.6 and 2.7). Recently, it has been demonstrated that T3 activates ERK1/2 by two different mechanisms. One is independent of PI3-kinase activating cell proliferation, while the other is PI3-kinase dependent involving various actions such as protein trafficking (87). The exact mechanism, by which T3 activates PI3-kinase in liver leading to ERK1/2 MAPK activation, remains to be determined. In human fibroblasts, in presence of T3, the TR β receptor is able to directly interact with p85 α , the regulatory subunit of PI3-kinase, leading to downstream activation of Akt, mTOR and p70^{S6K} (62). This cascade activates the transcription of the ZAK1-4 α gene in response to T3 (13). At the hepatic level, we showed that T3 activates PI3-kinase but not Akt (Fig. 2.8). In general, activation of PI3-kinase leads to Akt activation. However, PI3-kinase needs to be

recruited to the plasma membrane in order to adequately activates Akt (18, 69). But, in presence of T3, TR specifically interacts with the cytosolic p85 α regulatory subunit of PI3-kinase (14). In adult rat alveolar epithelial cells, T3 increased Na,K-ATPase activity in a transcription-independent manner *via* the activation of two distinct pathways: a PI3-kinase (56) and a ERK1/2 MAPK pathway (55). They also demonstrated that T3 stimulates the PI3K-Akt pathway *via* the Src family of tyrosine kinases.

Independently of PI3-kinase, thyroid hormones can also bind to an integrin $\alpha(v)\beta(3)$ cell surface receptor, leading to the activation of Erk1/2 MAPK and its nuclear translocation (6, 21). In the nucleus, Erk1/2 MAPK phosphorylate TR (22, 80), leading to the dissociation of the SMRT and NCoR co-repressors. Subsequently, this will increase the degradation of the co-repressors and induce the transcription (42, 57, 89). TR phosphorylation would also help the heterodimerization with RXR, increasing the binding of the TR/RXR complex to the TRE (7, 45). The SRC-1 co-activators, which are recruited to the TR transcriptional complex, have also been described to be a target of Erk1/2 MAPK (77). In addition, the MAPK/TR complex would also be able to bind and phosphorylate the p53 (80) and STAT transcription factors (59), modulating the transcription of other target genes.

In conclusion, in the present study, we showed (Fig. 2.9) that in hepatic cells, T3 regulates the transcription of FAS through a genomic action involving the binding of a TR/RXR heterodimer to the T3 response element. Moreover, T3 can also act *via* a non-genomic mechanism, involving the activation of PI3-kinase, which subsequently activates Erk1/2-MAPK, increasing FAS transcription. On the other hand, the binding of insulin on its membrane receptor leads to the activation of both PI3-kinase/Akt and Ras/Raf/Erk1/2-MAPK signaling pathways, activating FAS transcription *via* the TRE.

Grant: *This work was supported by the National Sciences and Engineering Research Council of Canada.*

2.6 References

1. **Alisi A, Spagnuolo S, Napoletano S, Spaziani A, and Leoni S.** Thyroid hormones regulate DNA-synthesis and cell-cycle proteins by activation of PKC α and p42/44 MAPK in chick embryo hepatocytes. *J Cell Physiol* 201: 259-265, 2004.
2. **Andrews NC, and Faller DV.** A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 19: 2499, 1991.
3. **Back DW, Goldman MJ, Fisch JE, Ochs RS, and Goodridge AG.** The fatty acid synthase gene in avian liver. Two mRNAs are expressed and regulated in parallel by feeding, primarily at the level of transcription. *J Biol Chem* 261: 4190-4197, 1986.
4. **Baniahmad A, Ha I, Reinberg D, Tsai S, Tsai MJ, and O'Malley BW.** Interaction of human thyroid hormone receptor beta with transcription factor TFIIB may mediate target gene derepression and activation by thyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 8832-8836, 1993.
5. **Bassett JH, Harvey CB, and Williams GR.** Mechanisms of thyroid hormone receptor-specific nuclear and extra nuclear actions. *Mol Cell Endocrinol* 213: 1-11, 2003.
6. **Bergh JJ, Lin HY, Lansing L, Mohamed SN, Davis FB, Mousa S, and Davis PJ.** Integrin α V β 3 contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis. *Endocrinology* 146: 2864-2871, 2005.
7. **Bhat MK, Ashizawa K, and Cheng SY.** Phosphorylation enhances the target gene sequence-dependent dimerization of thyroid hormone receptor with retinoid X receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 7927-7931, 1994.
8. **Bigler J, and Eisenman RN.** Novel location and function of a thyroid hormone response element. *Embo J* 14: 5710-5723, 1995.

9. **Blake WL, and Clarke SD.** Suppression of rat hepatic fatty acid synthase and S14 gene transcription by dietary polyunsaturated fat. *J Nutr* 120: 1727-1729, 1990.
10. **Blennemann B, Moon YK, and Freake HC.** Tissue-specific regulation of fatty acid synthesis by thyroid hormone. *Endocrinology* 130: 637-643, 1992.
11. **Bogazzi F, Hudson LD, and Nikodem VM.** A novel heterodimerization partner for thyroid hormone receptor. Peroxisome proliferator-activated receptor. *J Biol Chem* 269: 11683-11686, 1994.
12. **Bradford MM.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254, 1976.
13. **Cao X, Kambe F, Miyazaki T, Sarkar D, Ohmori S, and Seo H.** Novel human ZAKI-4 isoforms: hormonal and tissue-specific regulation and function as calcineurin inhibitors. *Biochem J* 367: 459-466, 2002.
14. **Cao X, Kambe F, Moeller LC, Refetoff S, and Seo H.** Thyroid hormone induces rapid activation of Akt/protein kinase B-mammalian target of rapamycin-p70S6K cascade through phosphatidylinositol 3-kinase in human fibroblasts. *Mol Endocrinol* 19: 102-112, 2005.
15. **Castellani LW, Wilcox HC, and Heimberg M.** Relationships between fatty acid synthesis and lipid secretion in the isolated perfused rat liver: effects of hyperthyroidism, glucose and oleate. *Biochim Biophys Acta* 1086: 197-208, 1991.
16. **Chomczynski P, and Sacchi N.** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159, 1987.
17. **Clarke SD, Armstrong MK, and Jump DB.** Dietary polyunsaturated fats uniquely suppress rat liver fatty acid synthase and S14 mRNA content. *J Nutr* 120: 225-231, 1990.
18. **Dai Y, Wei Z, Sephton CF, Zhang D, Anderson DH, and Mousseau DD.** Haloperidol induces the nuclear translocation of phosphatidylinositol 3'-kinase to disrupt Akt phosphorylation in PC12 cells. *J Psychiatry Neurosci* 32: 323-330, 2007.

19. **Das DK, and Ganguly M.** Mechanism of the control of pulmonary and hepatic fatty acid synthesis by the thyroid hormones. *Arch Biochem Biophys* 218: 142-155, 1982.
20. **Davis PJ, and Davis FB.** Nongenomic actions of thyroid hormone on the heart. *Thyroid* 12: 459-466, 2002.
21. **Davis PJ, Leonard JL, and Davis FB.** Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone. *Front Neuroendocrinol* 29: 211-218, 2008.
22. **Davis PJ, Shih A, Lin HY, Martino LJ, and Davis FB.** Thyroxine promotes association of mitogen-activated protein kinase and nuclear thyroid hormone receptor (TR) and causes serine phosphorylation of TR. *J Biol Chem* 275: 38032-38039, 2000.
23. **Davis PJ, Tillmann HC, Davis FB, and Wehling M.** Comparison of the mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone and steroid hormones. *J Endocrinol Invest* 25: 377-388, 2002.
24. **Dayton S, Dayton J, Drimmer F, and Kendall FE.** Rates of acetate turnover and lipid synthesis in normal, hypothyroid and hyperthyroid rats. *Am J Physiol* 199: 71-76, 1960.
25. **Diamant S, Gorin E, and Shafrir E.** Enzyme activities related to fatty-acid synthesis in liver and adipose tissue of rats treated with triiodothyronine. *Eur J Biochem* 26: 553-559, 1972.
26. **Favata MF, Horiuchi KY, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA, Feeser WS, Van Dyk DE, Pitts WJ, Earl RA, Hobbs F, Copeland RA, Magolda RL, Scherle PA, and Trzaskos JM.** Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem* 273: 18623-18632, 1998.
27. **Forman BM, Casanova J, Raaka BM, Ghysdael J, and Samuels HH.** Half-site spacing and orientation determines whether thyroid hormone and retinoic acid receptors and related factors bind to DNA response elements as monomers, homodimers, or heterodimers. *Mol Endocrinol* 6: 429-442, 1992.

28. **Freake HC, Schwartz HL, and Oppenheimer JH.** The regulation of lipogenesis by thyroid hormone and its contribution to thermogenesis. *Endocrinology* 125: 2868-2874, 1989.
29. **Friedman JE, Ishizuka T, Shao J, Huston L, Highman T, and Catalano P.** Impaired glucose transport and insulin receptor tyrosine phosphorylation in skeletal muscle from obese women with gestational diabetes. *Diabetes* 48: 1807-1814, 1999.
30. **Gandemer G, Pascal G, and Durand G.** [De novo lipogenesis: kinetics of in vivo incorporation of tritiated water ^3H into fatty acids and total lipids of the liver, plasma, adipose tissue and carcass of the male rat]. *C R Seances Acad Sci D* 290: 1479-1482, 1980.
31. **Gibson DM, Titchener EB, and Wakil SJ.** Studies on the mechanism of fatty acid synthesis. V. Bicarbonate requirement for the synthesis of long-chain fatty acids. *Biochim Biophys Acta* 30: 376-383, 1958.
32. **Glass CK.** Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. *Endocr Rev* 15: 391-407, 1994.
33. **Glineur C, Bailly M, and Ghysdael J.** The c-erbA alpha-encoded thyroid hormone receptor is phosphorylated in its amino terminal domain by casein kinase II. *Oncogene* 4: 1247-1254, 1989.
34. **Goodridge AG.** Dietary regulation of gene expression: enzymes involved in carbohydrate and lipid metabolism. *Annu Rev Nutr* 7: 157-185, 1987.
35. **Goodridge AG.** Regulation of fatty acid synthesis in isolated hepatocytes prepared from the livers of neonatal chicks. *J Biol Chem* 248: 1924-1931, 1973.
36. **Goodridge AG.** Regulation of the activity of acetyl coenzyme A carboxylase by palmitoyl coenzyme A and citrate. *J Biol Chem* 247: 6946-6952, 1972.
37. **Goodridge AG, Carpenter WR, Fisch JE, Goldman MJ, Kameda K, and Stapleton SR.** Structure and regulation of the avian gene for fatty acid synthase. *Reprod Nutr Dev* 29: 359-375, 1989.
38. **Hadzic E, Desai-Yajnik V, Helmer E, Guo S, Wu S, Koudinova N, Casanova J, Raaka BM, and Samuels HH.** A 10-amino-acid sequence in the N-

terminal A/B domain of thyroid hormone receptor alpha is essential for transcriptional activation and interaction with the general transcription factor TFIIB. *Mol Cell Biol* 15: 4507-4517, 1995.

39. **Hallenbeck PL, Marks MS, Lippoldt RE, Ozato K, and Nikodem VM.** Heterodimerization of thyroid hormone (TH) receptor with H-2RIIBP (RXR beta) enhances DNA binding and TH-dependent transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 5572-5576, 1992.

40. **Horlein AJ, Naar AM, Heinzl T, Torchia J, Gloss B, Kurokawa R, Ryan A, Kamei Y, Soderstrom M, Glass CK, and et al.** Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* 377: 397-404, 1995.

41. **Iritani N, Nishimoto N, Katsurada A, and Fukuda H.** Regulation of hepatic lipogenic enzyme gene expression by diet quantity in rats fed a fat-free, high carbohydrate diet. *J Nutr* 122: 28-36, 1992.

42. **Jones KE, Brubaker JH, and Chin WW.** Evidence that phosphorylation events participate in thyroid hormone action. *Endocrinology* 134: 543-548, 1994.

43. **Jump DB, Clarke SD, Thelen A, Liimatta M, Ren B, and Badin M.** Dietary polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription. *Prog Lipid Res* 35: 227-241, 1996.

44. **Kameda K, and Goodridge AG.** Isolation and partial characterization of the gene for goose fatty acid synthase. *J Biol Chem* 266: 419-426, 1991.

45. **Katz D, Reginato MJ, and Lazar MA.** Functional regulation of thyroid hormone receptor variant TR alpha 2 by phosphorylation. *Mol Cell Biol* 15: 2341-2348, 1995.

46. **Kim JB, Sarraf P, Wright M, Yao KM, Mueller E, Solanes G, Lowell BB, and Spiegelman BM.** Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1. *J Clin Invest* 101: 1-9, 1998.

47. **Kliwer SA, Umesono K, Mangelsdorf DJ, and Evans RM.** Retinoid X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D3 signalling. *Nature* 355: 446-449, 1992.
48. **Kurokawa R, Yu VC, Naar A, Kyakumoto S, Han Z, Silverman S, Rosenfeld MG, and Glass CK.** Differential orientations of the DNA-binding domain and carboxy-terminal dimerization interface regulate binding site selection by nuclear receptor heterodimers. *Genes Dev* 7: 1423-1435, 1993.
49. **Kwok RP, Lundblad JR, Chrivia JC, Richards JP, Bachinger HP, Brennan RG, Roberts SG, Green MR, and Goodman RH.** Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. *Nature* 370: 223-226, 1994.
50. **Lakshmanan MR, Nepokroeff CM, and Porter JW.** Control of the synthesis of fatty-acid synthetase in rat liver by insulin, glucagon, and adenosine 3':5' cyclic monophosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69: 3516-3519, 1972.
51. **Latasa MJ, Griffin MJ, Moon YS, Kang C, and Sul HS.** Occupancy and function of the -150 sterol regulatory element and -65 E-box in nutritional regulation of the fatty acid synthase gene in living animals. *Mol Cell Biol* 23: 5896-5907, 2003.
52. **Laux T, and Schweizer M.** Dietary-induced pre-translational control of rat fatty acid synthase. *Biochem J* 266: 793-797, 1990.
53. **Lazar MA.** Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. *Endocr Rev* 14: 184-193, 1993.
54. **Lee JW, Choi HS, Gyuris J, Brent R, and Moore DD.** Two classes of proteins dependent on either the presence or absence of thyroid hormone for interaction with the thyroid hormone receptor. *Mol Endocrinol* 9: 243-254, 1995.
55. **Lei J, Mariash CN, Bhargava M, Wattenberg EV, and Ingbar DH.** T3 increases Na-K-ATPase activity via a MAPK/ERK1/2-dependent pathway in rat adult alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294: L749-754, 2008.
56. **Lei J, Mariash CN, and Ingbar DH.** 3,3',5-Triiodo-L-thyronine up-regulation of Na,K-ATPase activity and cell surface expression in alveolar epithelial

cells is Src kinase- and phosphoinositide 3-kinase-dependent. *J Biol Chem* 279: 47589-47600, 2004.

57. **Leitman DC, Costa CH, Graf H, Baxter JD, and Ribeiro RC.** Thyroid hormone activation of transcription is potentiated by activators of cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 271: 21950-21955, 1996.

58. **Leveille GA, O'Hea EK, and Chakrabarty K.** In vivo lipogenesis in the domestic chicken. *Proc Soc Exp Biol Med* 128: 398-401, 1968.

59. **Lin HY, Davis FB, Gordinier JK, Martino LJ, and Davis PJ.** Thyroid hormone induces activation of mitogen-activated protein kinase in cultured cells. *Am J Physiol* 276: C1014-1024, 1999.

60. **Lin KH, Ashizawa K, and Cheng SY.** Phosphorylation stimulates the transcriptional activity of the human beta 1 thyroid hormone nuclear receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 7737-7741, 1992.

61. **Llobera M, Muniesa A, and Herrera E.** Effects of hypo- and hyperthyroidism on in vivo lipogenesis in fed and fasted rats. *Horm Metab Res* 11: 628-634, 1979.

62. **Losel RM, Falkenstein E, Feuring M, Schultz A, Tillmann HC, Rossol-Haseroth K, and Wehling M.** Nongenomic steroid action: controversies, questions, and answers. *Physiol Rev* 83: 965-1016, 2003.

63. **Magana MM, Koo SH, Towle HC, and Osborne TF.** Different sterol regulatory element-binding protein-1 isoforms utilize distinct co-regulatory factors to activate the promoter for fatty acid synthase. *J Biol Chem* 275: 4726-4733, 2000.

64. **Moon YS, Latasa MJ, Griffin MJ, and Sul HS.** Suppression of fatty acid synthase promoter by polyunsaturated fatty acids. *J Lipid Res* 43: 691-698, 2002.

65. **Morris SM, Jr., Nilson JH, Jenik RA, Winberry LK, McDevitt MA, and Goodridge AG.** Molecular cloning of gene sequences for avian fatty acid synthase and evidence for nutritional regulation of fatty acid synthase mRNA concentration. *J Biol Chem* 257: 3225-3229, 1982.

66. **Morris SM, Jr., Winberry LK, Fisch JE, Back DW, and Goodridge AG.** Developmental and nutritional regulation of the messenger RNAs for fatty acid synthase, malic enzyme and albumin in the livers of embryonic and newly-hatched chicks. *Mol Cell Biochem* 64: 63-68, 1984.
67. **Mounier C, and Posner BI.** Transcriptional regulation by insulin: from the receptor to the gene. *Can J Physiol Pharmacol* 84: 713-724, 2006.
68. **Moustaid N, Beyer RS, and Sul HS.** Identification of an insulin response element in the fatty acid synthase promoter. *J Biol Chem* 269: 5629-5634, 1994.
69. **Murata H, Hresko RC, and Mueckler M.** Reconstitution of phosphoinositide 3-kinase-dependent insulin signaling in a cell-free system. *J Biol Chem* 278: 21607-21614, 2003.
70. **Nejad NS, Chaikoff IL, and Hill R.** Hormonal repair of defective lipogenesis from glucose in the liver of the hypophysectomized rat. *Endocrinology* 71: 107-112, 1962.
71. **Onate SA, Tsai SY, Tsai MJ, and O'Malley BW.** Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* 270: 1354-1357, 1995.
72. **Paulauskis JD, and Sul HS.** Cloning and expression of mouse fatty acid synthase and other specific mRNAs. Developmental and hormonal regulation in 3T3-L1 cells. *J Biol Chem* 263: 7049-7054, 1988.
73. **Paulauskis JD, and Sul HS.** Hormonal regulation of mouse fatty acid synthase gene transcription in liver. *J Biol Chem* 264: 574-577, 1989.
74. **Perlmann T, Rangarajan PN, Umesono K, and Evans RM.** Determinants for selective RAR and TR recognition of direct repeat HREs. *Genes Dev* 7: 1411-1422, 1993.
75. **Roncari DA, and Murthy VK.** Effects of thyroid hormones on enzymes involved in fatty acid and glycerolipid synthesis. *J Biol Chem* 250: 4134-4138, 1975.

76. **Roncero C, and Goodridge AG.** Hexanoate and octanoate inhibit transcription of the malic enzyme and fatty acid synthase genes in chick embryo hepatocytes in culture. *J Biol Chem* 267: 14918-14927, 1992.
77. **Rowan BG, Weigel NL, and O'Malley BW.** Phosphorylation of steroid receptor coactivator-1. Identification of the phosphorylation sites and phosphorylation through the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 275: 4475-4483, 2000.
78. **Sambrook J, Russell, D.W.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New-York: Cold Spring Harbor, 2000.
79. **Schwarz JM, Linfoot P, Dare D, and Aghajanian K.** Hepatic de novo lipogenesis in normoinsulinemic and hyperinsulinemic subjects consuming high-fat, low-carbohydrate and low-fat, high-carbohydrate isoenergetic diets. *Am J Clin Nutr* 77: 43-50, 2003.
80. **Shih A, Lin HY, Davis FB, and Davis PJ.** Thyroid hormone promotes serine phosphorylation of p53 by mitogen-activated protein kinase. *Biochemistry* 40: 2870-2878, 2001.
81. **Soncini M, Yet SF, Moon Y, Chun JY, and Sul HS.** Hormonal and nutritional control of the fatty acid synthase promoter in transgenic mice. *J Biol Chem* 270: 30339-30343, 1995.
82. **Spirtes MA, Medes G, and Weinhouse S.** Fatty acid synthesis in hyperthyroidism. *Am J Med Sci* 225: 580-581, 1953.
83. **Stapleton SR, Mitchell DA, Salati LM, and Goodridge AG.** Triiodothyronine stimulates transcription of the fatty acid synthase gene in chick embryo hepatocytes in culture. Insulin and insulin-like growth factor amplify that effect. *J Biol Chem* 265: 18442-18446, 1990.
84. **Stoops JK, Arslanian MJ, Oh YH, Aune KC, Vanaman TC, and Wakil SJ.** Presence of two polypeptide chains comprising fatty acid synthetase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72: 1940-1944, 1975.

85. **Sugawara A, Yen PM, Apriletti JW, Ribeiro RC, Sacks DB, Baxter JD, and Chin WW.** Phosphorylation selectively increases triiodothyronine receptor homodimer binding to DNA. *J Biol Chem* 269: 433-437, 1994.
86. **Sul HS, and Wang D.** Nutritional and hormonal regulation of enzymes in fat synthesis: studies of fatty acid synthase and mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase gene transcription. *Annu Rev Nutr* 18: 331-351, 1998.
87. **Sun M., Simone T.M., Keating T., Tang H.Y., Lin C., Mousa S.A., Lin H.Y., Davis F.B., and Davis P.J. .** [P2-16] Activation by Thyroid Hormone of Mitogen-Activated Protein Kinase and Phosphatidylinositol 3-Kinase: L-Thyroxine vs. 3,5,3-Triiodo-L-Thyronine and Cancer Cell Proliferation. *The endocrine Society's 90th annual meeting* POSTER SESSION: BASIC - Steroid Nuclear Receptors (AR VDR Thyroid Receptors, MR) 2008.
88. **Swierczynski J, Mitchell DA, Reinhold DS, Salati LM, Stapleton SR, Klautky SA, Struve AE, and Goodridge AG.** Triiodothyronine-induced accumulations of malic enzyme, fatty acid synthase, acetyl-coenzyme A carboxylase, and their mRNAs are blocked by protein kinase inhibitors. Transcription is the affected step. *J Biol Chem* 266: 17459-17466, 1991.
89. **Ting YT, and Cheng SY.** Hormone-activated phosphorylation of human beta1 thyroid hormone nuclear receptor. *Thyroid* 7: 463-469, 1997.
90. **Umesono K, Murakami KK, Thompson CC, and Evans RM.** Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors. *Cell* 65: 1255-1266, 1991.
91. **Wakil SJ.** Fatty acid synthase, a proficient multifunctional enzyme. *Biochemistry* 28: 4523-4530, 1989.
92. **Wakil SJ, Stoops JK, and Joshi VC.** Fatty acid synthesis and its regulation. *Annu Rev Biochem* 52: 537-579, 1983.
93. **Wang D, and Sul HS.** Insulin stimulation of the fatty acid synthase promoter is mediated by the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. Involvement of protein kinase B/Akt. *J Biol Chem* 273: 25420-25426, 1998.

94. **Wang D, and Sul HS.** Upstream stimulatory factors bind to insulin response sequence of the fatty acid synthase promoter. USF1 is regulated. *J Biol Chem* 270: 28716-28722, 1995.
95. **Wang Y, Jones Voy B, Urs S, Kim S, Soltani-Bejnood M, Quigley N, Heo YR, Standridge M, Andersen B, Dhar M, Joshi R, Wortman P, Taylor JW, Chun J, Leuze M, Claycombe K, Saxton AM, and Moustaid-Moussa N.** The human fatty acid synthase gene and de novo lipogenesis are coordinately regulated in human adipose tissue. *J Nutr* 134: 1032-1038, 2004.
96. **Wilson SB, Back DW, Morris SM, Jr., Swierczynski J, and Goodridge AG.** Hormonal regulation of lipogenic enzymes in chick embryo hepatocytes in culture. Expression of the fatty acid synthase gene is regulated at both translational and pretranslational steps. *J Biol Chem* 261: 15179-15182, 1986.
97. **Yen PM.** Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev* 81: 1097-1142, 2001.
98. **Yen PM, Darling DS, Carter RL, Forgione M, Umeda PK, and Chin WW.** Triiodothyronine (T3) decreases binding to DNA by T3-receptor homodimers but not receptor-auxiliary protein heterodimers. *J Biol Chem* 267: 3565-3568, 1992.

2.7 Figure legends

Figure 2.1: Effects of T3 and insulin on FAS enzymatic activity, protein and mRNA levels- **A-** HepG2 cells were incubated for 24h with or without T3 and/or insulin at the concentrations indicated in the figure. The cells were lysed. Extracted proteins were resolved on 7% SDS-PAGE, and immunoblotted with an anti-FAS antibody. **B-** Chick embryo hepatocytes were incubated for 24h with or without 1.6 μ M of T3 and/or 100nM of insulin, as indicated in the figure. FAS activity was evaluated as indicated in the Materials and Methods section. Results are expressed as a percentage of the activity measured in the untreated sample, and are the mean of at least 3 independent experiments. The bars indicate the standard deviation (SD). * $p < 0.05$ comparing T3 or insulin treated cells *versus* untreated cells. **C-** HepG2 cells were treated as described above. Total RNA was extracted and FAS mRNA expression was evaluated through qPCR as described in the Material and Methods section. The results are expressed as a percentage of the mRNA level measured in non-treated cells. The results represent the mean of at least 3 independent experiments. The bars indicate the standard deviation (SD). * $p < 0.05$ comparing T3 or insulin treated cells *versus* untreated cells.

Figure 2.2: Localization of the TRE on the goose FAS gene promoter. **A-** HepG2 cells were transiently transfected with various CAT DNA constructs (*left panel*, 1.5 μ g/well) and pRSV- β Gal (0.5 μ g/well) as described in the Materials and Methods section. After removing the transfection medium, the hepatocytes were incubated for 24h in MEM (*white bars*) or in the same medium containing 1.6 μ M of T3 (*hatched bars*), 100nM insulin (*black bars*) or both hormones (*crossed bars*). CAT activities were measured using a CAT ELISA kit. Results are expressed as CAT activities normalized by β -galactosidase activity per milligram of soluble protein. They are represented as a percentage of the activity measured in the respective untreated

sample and are the mean of at least 3 independent experiments. The bars indicate the standard deviation (SD). * $p < 0.05$ compared to untreated cells. **B-** Sequence comparison of the goose FAS promoter (H:#AY391824) to the human (H:#250144), mouse (M:#AL663090), rat (X:#X54871) and chicken (C:#X77339) FAS promoters. The conserved bases in the TRE between the five species are underlined.

Figure 2.3: Mobility Shift Assays using the fragment located between -732 and -692bp of the goose FAS gene. **A-** Sequence corresponding to a -732 to -692bp fragment of the FAS gene and used as a probe in the EMSA experiment. The TRE sequence is presented in empty boxes. **B-** 6 μ g of nuclear extract prepared from non-treated HepG2 cells (lines 2 to 4) or cells treated for 24h with 1.6 μ M T3 (lines 5 to 7), 100nM insulin (lines 8 to 10), or with both hormones (lines 11 to 13), were incubated with the 32 P-labeled double-stranded FAS promoter fragment. Antibodies (2 μ g each) were added after mixing labeled probe and nuclear extract; they were anti-TR α 1/Tr β 1 (lines 3, 6, 9, 12) or anti-RXR α / β / γ (lines 4, 7, 10, 13). The reaction migrated in line 14 contains a non-specific IgG-HRP antibody. The DNA-protein complex corresponding to the TR/RXR heterodimer is designated by the arrow. The free probe not having bound the protein is also indicated. This autoradiography is representative of 3 independent experiments. The presented histogram, at the bottom, corresponds to the densitometry quantification of the TR/RXR complex. The bars indicate the standard deviation (SD).

Figure 2.4: Role of phosphorylation in the regulation of FAS activity and transcription in response to T3 and insulin treatments. **A-** CEH were incubated for 24h without hormone (*white bar*) or with 100nM insulin for 10h and subsequently for 14h with 1.6 μ M T3 (*hatched bar*) or with 1.6 μ M T3 for 10h and subsequently for 14h with 100nM insulin (*black bar*). The *crossed bar* corresponds to an incubation of cells for 24h in presence of both hormones. FAS activities were measured as indicated in the Materials and Methods section. Results are expressed as a percentage

of the activity measured in the untreated sample, and are the mean of at least 3 independent experiments. The bars indicate the standard deviation (SD). * $p < 0.0001$ compared to 24h of treatment with both insulin and T3. **B-** CEH were incubated for 24h without hormone (*basal*) or with 1.6 μ M T3, 100nM insulin or with both hormones. 30 min before the hormonal stimulation, the cells are pre-incubated with either 0.5% DMSO (*black bars*), or with 5 μ M of genistein (*crossed bars*). FAS activities were measured as indicated in the Materials and Methods section. The results are expressed as a percentage of untreated cells (*basal*) incubated with DMSO and are the mean of at least 3 independent experiments **C-** CEH were incubated as described above except that 25 μ M of H7 was used instead of genistein (*crossed bars*). **D-** The HepG2 cells were transfected with the TRE-TK-CAT construction, as previously described in Fig. 2. The cells were then incubated for 24h without hormone (*basal*) or with 1.6 μ M T3, 100nM insulin, or with both hormones. 30 min before the hormonal stimulations, the cells were pre-incubated with 0.5% DMSO (*black bars*), or with 5 μ M of genistein (*crossed bars*). **E-** HepG2 cells were incubated as described above except that 25 μ M of H7 was used instead of genistein (*crossed bars*). In both cases, CAT activities were measured as described in Fig. 2. The results are expressed as a percentage of untreated cells (*basal*) incubated with DMSO, and are the mean of at least 3 independent experiments. The bars indicate the standard deviation (SD).

* $p < 0.005$ comparing the DMSO condition *versus* the treatments with the kinase inhibitors.

Figure 2.5: Effects of LY294002 and PD98059 on FAS activity and TRE-mediated transcription in response to T3 and insulin treatments. **A-** CEH were incubated for 24h without hormones (*basal*) or with 1.6 μ M of T3, 100nM of insulin, or both hormones. 30 min before hormonal stimulations, the cells were pre-incubated with 0.5% DMSO (*black bars*), 50 μ M of LY294002 (*hatched bars*) or 50 μ M of PD98059 (*crossed bars*). FAS activities were measured as indicated in the Materials

and Methods section. The results are expressed as a percentage of untreated cells (*basal*) incubated with DMSO, and are the mean of at least 3 independent experiments. The bars indicate the standard deviation (SD). * $p < 0.005$ comparing the DMSO condition *versus* the treatments with the kinase inhibitors. HepG2 cells were transfected with either the TRE-TK-CAT (**B**) or the DR4-TK-CAT construct (**C**) as previously described in Fig. 2. The cells were subsequently incubated for another 24 h without hormones (*basal*), or with $1.6\mu\text{M}$ of T3, 100nM of insulin, or with both hormones. 30 min before the hormonal stimulations, the cells were pre-incubated with 0.5% DMSO (*black bars*), with $50\mu\text{M}$ of LY294002 (*hatched bars*) or with $50\mu\text{M}$ of PD98059 (*crossed bars*). The CAT activities were measured as described in Fig. 2. The results are expressed as a percentage of untreated cells (*basal*) incubated with DMSO, and are the mean of at least 3 independent experiments. The bars indicate the standard deviation (SD). * $p < 0.005$ comparing the DMSO condition *versus* the treatments with the kinase inhibitors.

Figure 2.6: Effect of T3 and insulin on the level of Erk1/2 MAPK phosphorylation. **A-** CEH were serum deprived for 48h and incubated for 10 min with 100nM or $1.6\mu\text{M}$ of T3. **B-** CEH were serum deprived for 48h and subsequently incubated for different periods of time (0, 10, 30, 40, 60 and 90 min) with $1.6\mu\text{M}$ of T3 (*bottom panels*), 100nM of insulin (*middle panels*) or both hormones (*lower panels*). The cells were then lysed, and the cytosolic proteins were separated on a 10% SDS-PAGE and submitted to Western blotting with an antibody recognizing the phosphorylated form of Erk1/2 MAPK (P-p44), or an antibody recognizing the total Erk1/2 MAPK (p44). The autoradiographies are representative of 3 different experiments.

Figure 2.7: Effect of PD98059, U0126 and LY294002 on T3 and insulin-induced Erk1/2 MAPK phosphorylation. CEH were serum deprived for 48h and subsequently pre-incubated for 30 min with $50\mu\text{M}$ of PD98059, $20\mu\text{M}$ of U0126 or

50 μ M of LY294002, follow by 10 min of incubation with: **A-** 1.6 μ M of T3, **B-** 100nM of insulin or **C-** both hormones. The cells were then lysed and the levels of Erk1/2 phosphorylation were evaluated as described in Fig. 6. The autoradiographies are representative of 3 different experiments.

Figure 2.8: Effect of T3 and insulin on the level of Akt phosphorylation. CEH were serum deprived for 48h and subsequently incubated with 1.6 μ M of T3, 100nM of insulin or both hormones. The cells were then lysed, the cytosolic proteins were separated on a 10% SDS-PAGE and submitted to Western blotting with an antibody recognizing the Akt phosphorylated form (*top panel*), or an antibody recognizing the total Akt protein (*bottom panel*). The autoradiography is representative of 3 different experiments.

Figure 2.9: Schematic representation of the FAS transcriptional regulation in response to T3 and insulin. The binding of insulin on its membrane receptor leads to the activation of the PI3-kinase/Akt and the Ras/Raf/Erk1/2 MAPK pathways, both targeting the IRE and probably the TRE localized on the FAS promoter (*stippled arrows*). T3 can regulate the transcription of the FAS gene directly via a genomic mechanism, through the binding of TR/RXR heterodimer at the TRE level. However, T3 can modulate the TRE transcriptional activity *via* a non-genomic mechanism and, through the activation of a PI3-kinase/Erk1/2 MAPK dependent pathway (*full arrows*).

Figure 2.1

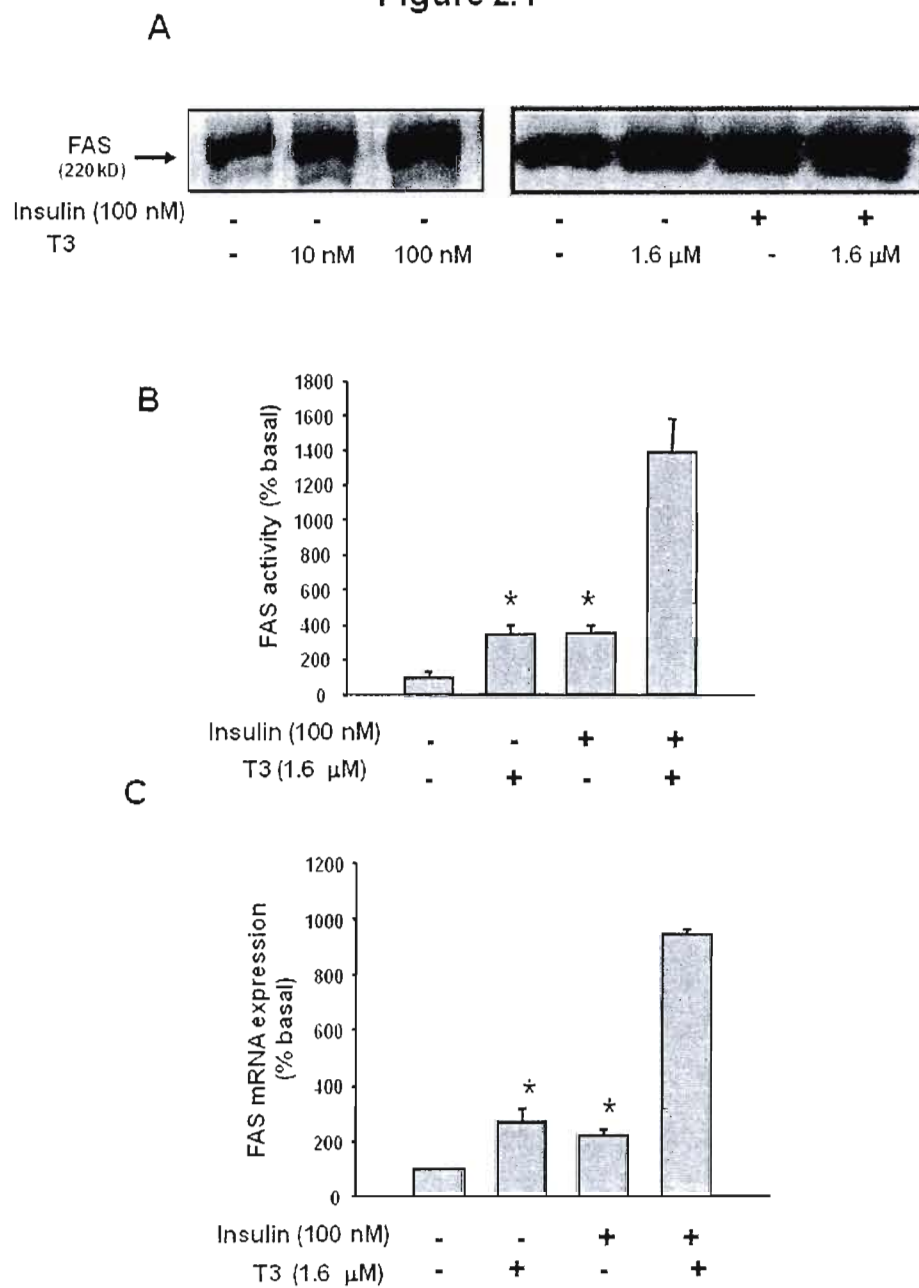
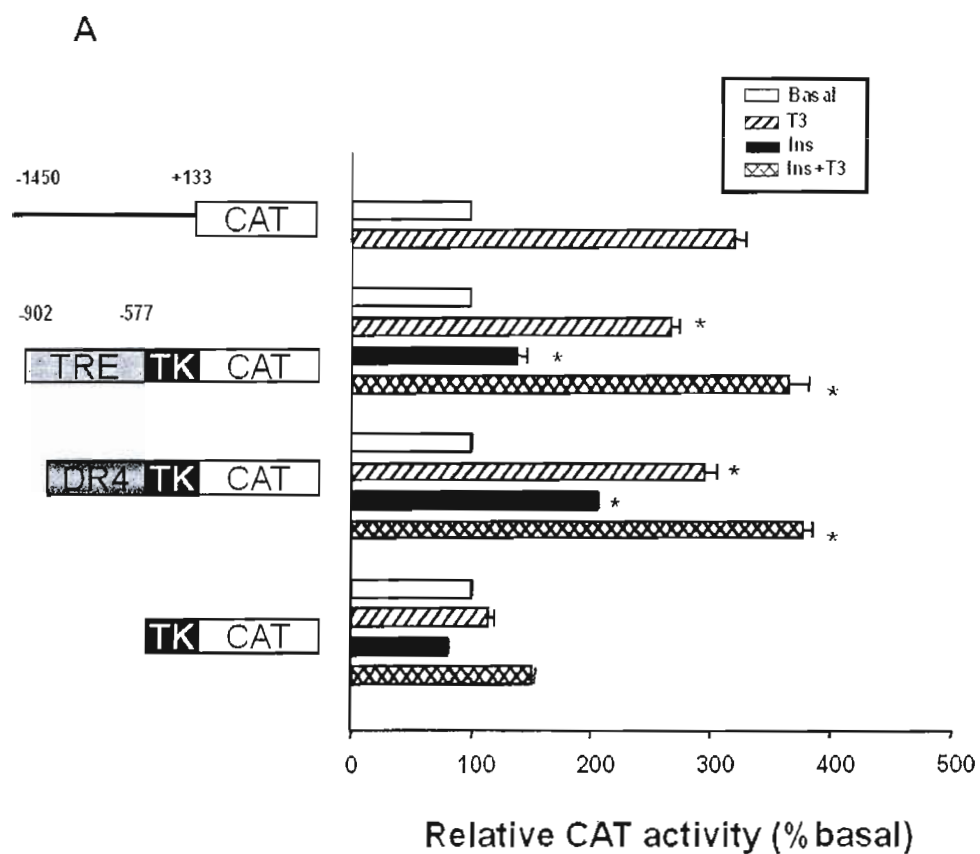


Figure 2.2

**B**

				TRE	TRE	
H	-771	GGAAAACCGG	GGATGCGCTG	CGAT <u>GACCGG</u>	CAGTA <u>ACCCC</u>	GGCCGGGGCG -722
M	-683	AGAAA	-GCTGGGCCA	CGAT <u>GACCGG</u>	TAGTA <u>ACCCC</u>	GCCTGAGGCG -640
R	-687	AGAAA	-GCTGGGCCA	CGAT <u>GACCGG</u>	TAGTA <u>ACCCC</u>	GCCTGAGGCG -644
C	-644	CGCATCCCCG	GCCGGCGTGC	CGCT <u>GACCTG</u>	TG <u>GTAACCTC</u>	GGC . . . GCCG598
G	-741	CGCATCCCCG	GCCGGCGTGC	CGCCGCCCTG	TG <u>GTAACCTC</u>	GGG . . .ACCG696

Figure 2.3

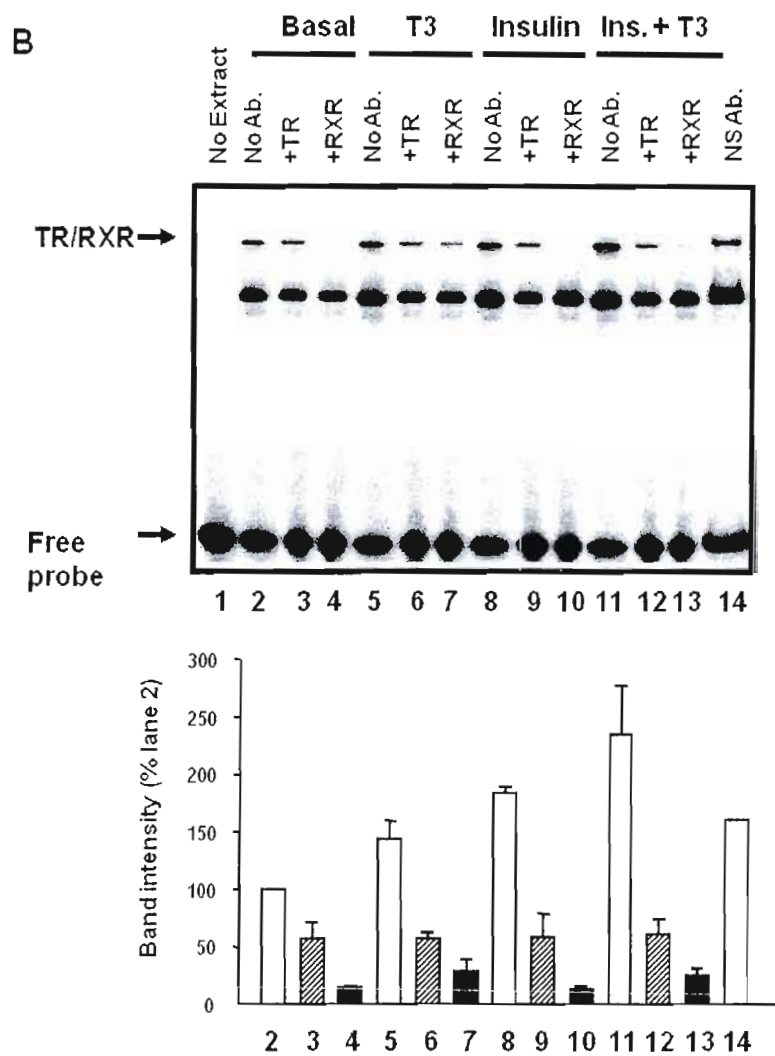
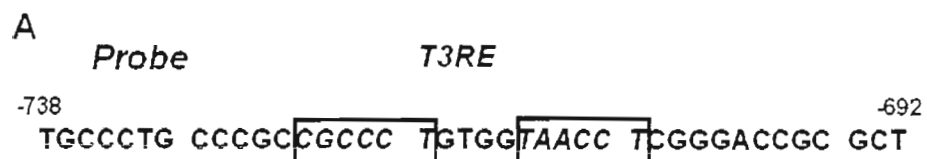


Figure 2.4

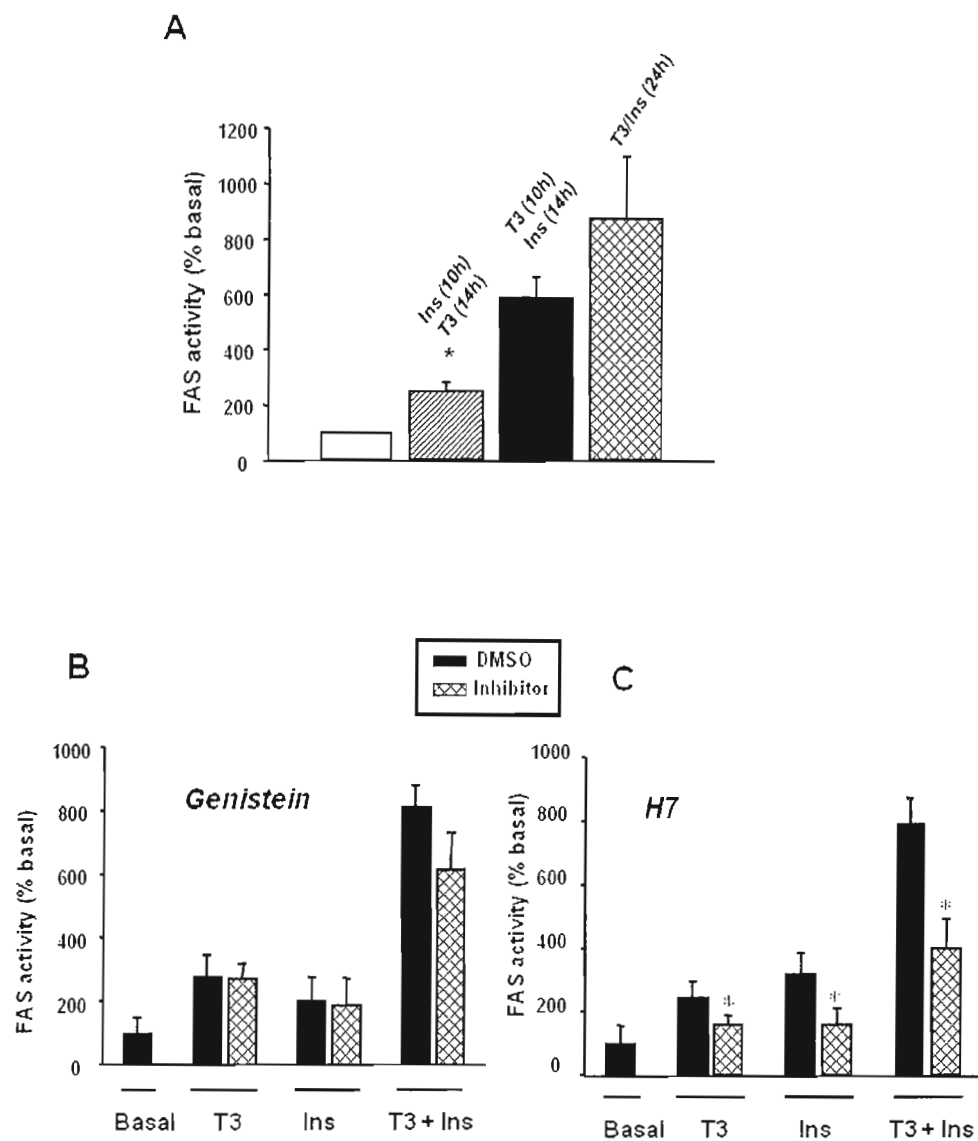


Figure 2.4

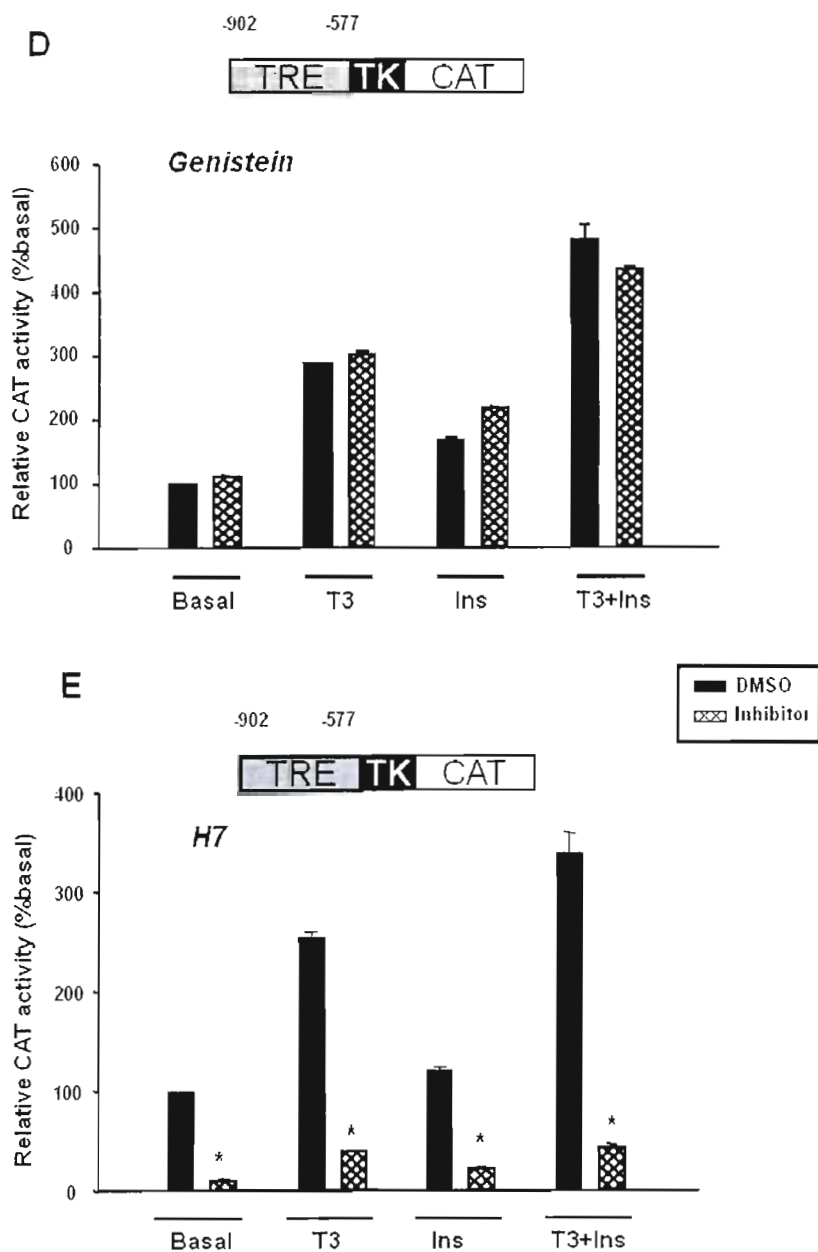


Figure 2.5

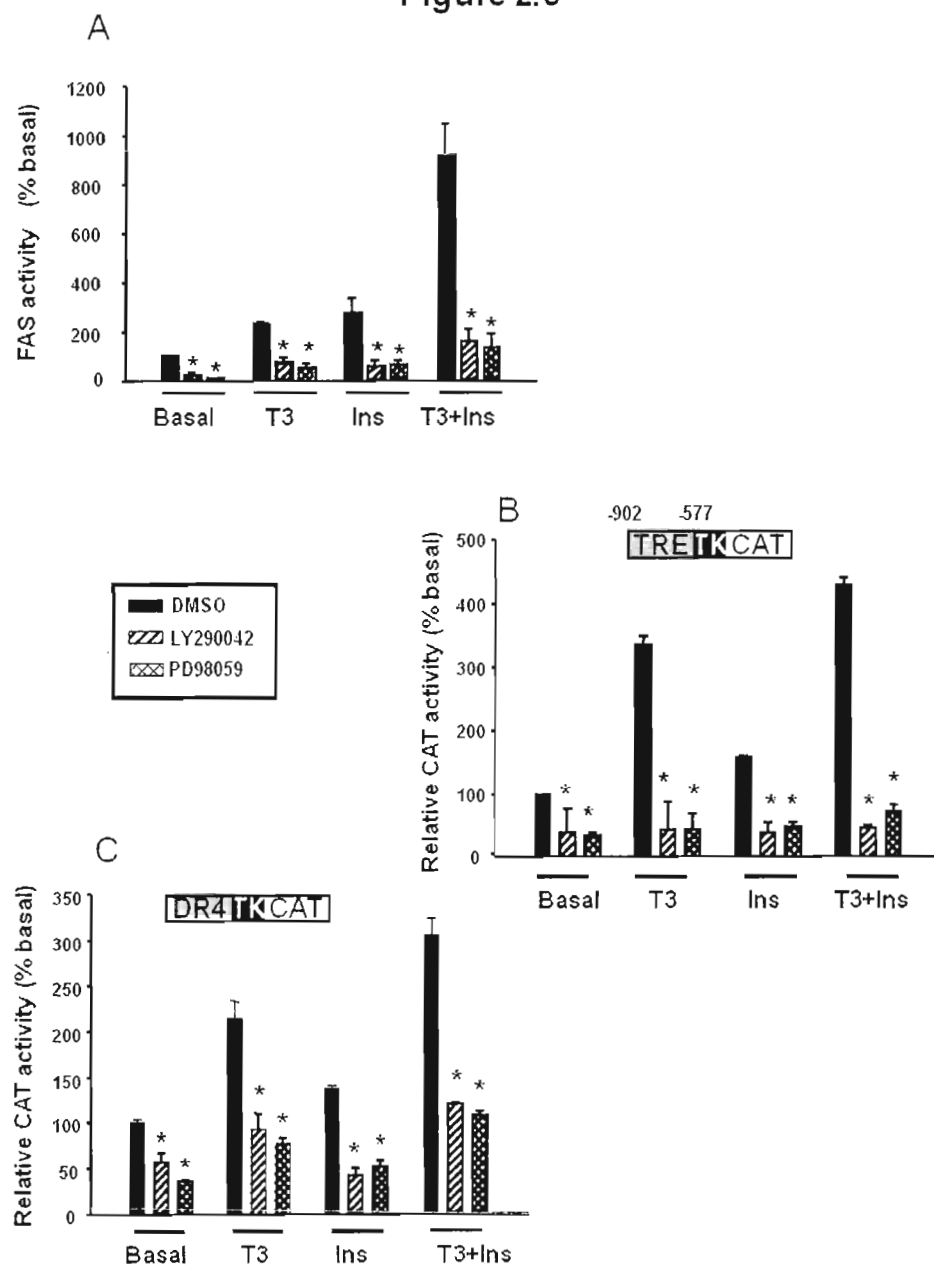
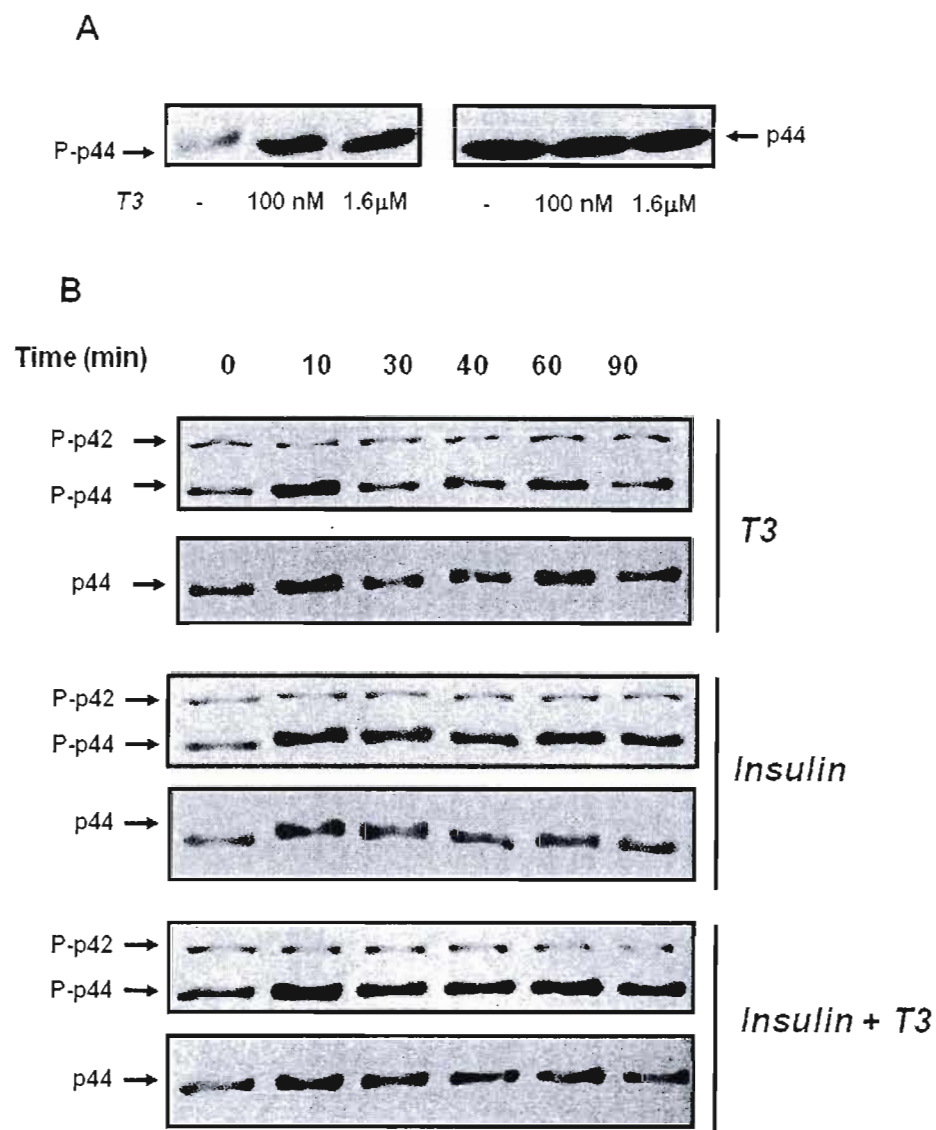


Figure 2.6



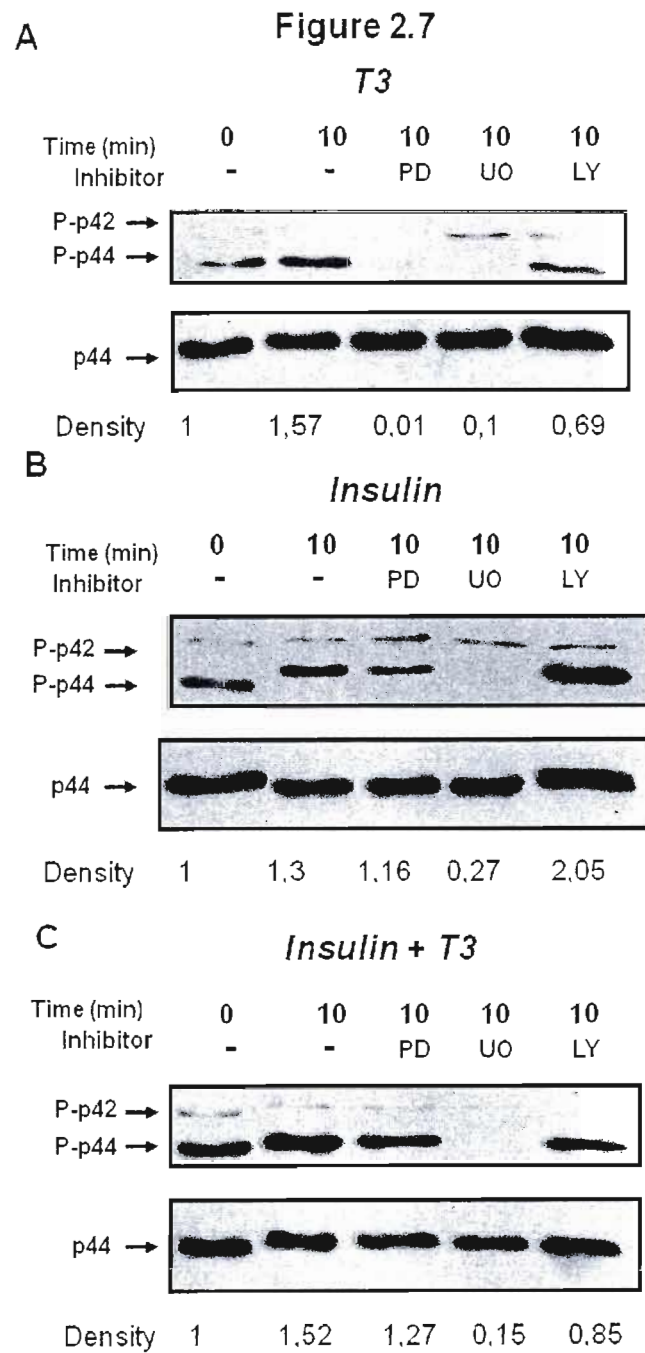
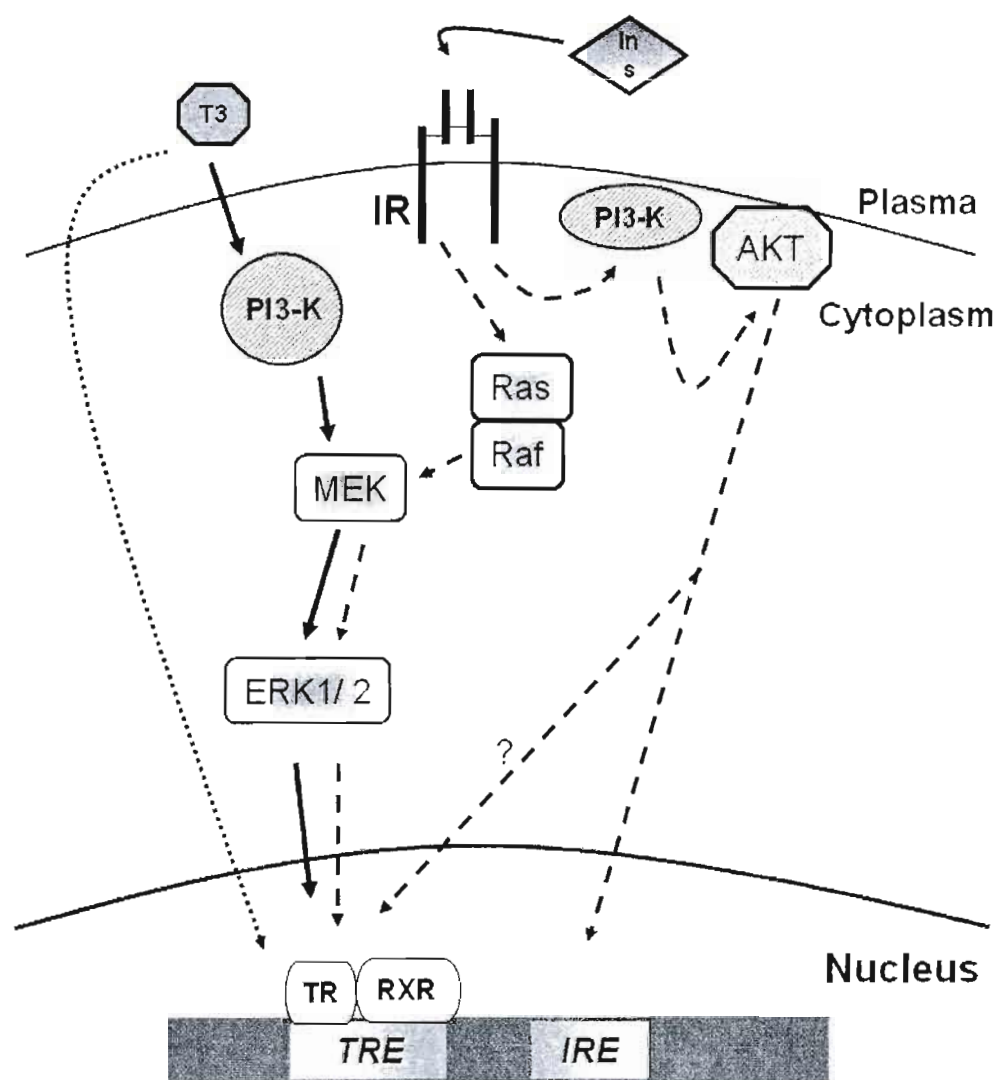


Figure 2.9



CHAPITRE III

DISCUSSION

Depuis une vingtaine d'année, l'obésité ($IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$) est en constante augmentation. Cette pandémie touche plus de 300 millions d'adultes et, est à l'origine de nombreuses pathologies telles que l'apnée du sommeil, les problèmes de fertilité ainsi que certains cancers. L'obésité est la pièce maîtresse du développement du « syndrome métabolique ». Ce terme couramment employé regroupe un grand nombre de pathologies dont l'obésité, la résistance à l'insuline, l'intolérance au glucose, l'hypertension ainsi que la dislipidémie qui se traduit par une hypertriglycémie associée à un faible niveau de HDL. Le syndrome métabolique est un facteur de risque majeur pour les pathologies cardiaques telles que l'artériosclérose (Kusunoki, Kanatani et al. 2006). La prévalence de ces pathologies entraîne des dépenses économiques très importantes pour les systèmes de santé. Il est donc primordial de comprendre les mécanismes moléculaires liés à la régulation du métabolisme des lipides étant donné que les approches traditionnelles de régime alimentaire n'aboutissent pas toujours à des résultats très probants.

L'obésité est induite par une augmentation de la lipogenèse *de novo* et une diminution de l'oxydation des acides gras. Plusieurs années de recherche dans ce domaine ont permis d'isoler différentes enzymes qui pourraient être des cibles thérapeutiques intéressantes pour lutter contre cette pandémie. L'inhibition de

certaines enzymes impliquées dans la lipogenèse *de novo* des acides gras comme l'ACC, la FAS, la SCD ou encore l'activation d'enzymes impliqués dans l'oxydation des acide gras comme l'AMPK sont des approches thérapeutiques intéressantes pour lutter contre l'obésité (Kusunoki, Kanatani et al. 2006). L'inhibition de la FAS par une drogue pharmacologique, le C75, a montré des effets anti-obésité très probant et est donc une piste de recherche très intéressante pour lutter contre la prise de poids. Des injections intrapéritonéales et intracérébroventriculaires à des souris entraînent une diminution de la prise alimentaire associée à une importante perte de poids (Loftus, Jaworsky et al. 2000). Cependant le C75 a des effets anorexigènes très importants dus à une modulation de la concentration des neuropeptides centraux. En effet, le C75 diminue le niveau d'expression des ARNm codant pour les neuropeptides orexigènes tels que le neuropeptide Y, AGRP (*Agouti-related peptide*) et augmente le niveau d'expression des ARNm codant pour les neuropeptides anorexigènes tels que la POMC (*pro-opiomelanocortin*) et CART (*cocaine-amphetamine-related transcript*) (Shimokawa, Kumar et al. 2002). Cependant, l'injection intracérébroventriculaire de C75 associé à un inhibiteur de l'ACC (TOFA) améliore les effets anorexigènes du C75, suggérant que le C75 régule l'appétit via le niveau de concentration en malonyl-CoA (Loftus, Jaworsky et al. 2000). Ces études suggèrent donc que l'inhibition de la FAS est un point incontournable de recherche puisque cette enzyme est impliquée à la fois dans la prise alimentaire et la lipogenèse. Cependant, une récente étude suggère aussi que le C75 pourrait directement activer CPT-1 et induire l'oxydation des lipides via un mécanisme indépendant de la FAS (Thupari, Landree et al. 2002).

Des études préliminaires réalisées principalement dans le laboratoire du professeur A.G. Goodridge ont montré que l'ajout d'acides gras à moyennes chaînes (6 à 8 carbones) est capable d'inhiber l'effet synergique de la T3 et de l'insuline au niveau de la transcription de la FAS (Roncero et Goodridge 1992) (Thurmond, Baillie et al. 1998). Ces MCFAs seraient donc des inhibiteurs potentiels de la FAS. Cependant, le mécanisme d'action des MCFAs qui semble avoir lieu au niveau du

TRE, reste encore à être élucidé. Il nécessite tout d'abord une parfaite compréhension du mécanisme de régulation de la FAS par la T3 et l'insuline, ce que nous sommes actuellement en train d'établir au laboratoire. Il semble que les MCFAs ne modulent pas la fixation de l'hormone sur son récepteur, ni du TR sur le TRE (Thurmond, Baillie et al. 1998). Différentes hypothèses sont alors envisageables. Les MCFAs pourraient agir *via* une fixation sur un récepteur de type de GPCR (Brown, Jupe et al. 2005) et activer ainsi différentes voies de signalisation, ce qui pourrait moduler le niveau de phosphorylation ou d'acétylation du complexe TR/RXR ou encore de différents co-activateurs ou co-répresseurs (Yen 2001). Les MCFAs pourraient aussi moduler la maturation de la protéine SREBP-1 entraînant une inhibition de la transcription induite par la T3 et l'insuline (Zhang, Yin et al. 2003). De nombreuses études sur le mécanisme d'action des acides gras à moyenne chaîne sont nécessaires afin de clarifier ces différents mécanismes. Cependant, l'utilisation des MCFAs comme inhibiteurs de la FAS est une piste intéressante à explorer dans le but de lutter contre l'obésité dans la mesure où ils peuvent être utilisés comme additifs alimentaires.

Dans cette étude, nous avons clairement mis en évidence que la T3 module la transcription de la FAS par 2 mécanismes distincts. La T3 régule la transcription de la FAS *via* un mécanisme d'action génomique bien connu. Dans ce cas, l'hormone entre dans la cellule et se fixe sur son récepteur nucléaire. Ceci aboutit à la fixation d'un complexe hormone/récepteur au niveau d'un élément de réponse à la T3. Cet élément de réponse à la T3 a été localisé par C. Martel, étudiante à la maîtrise dans le laboratoire du professeur C. Mounier entre -902 et -577 pb. Ce TRE est organisé en DR4 et fixe l'hétérodimère TR/RXR. Il a été montré que les complexes TR/RXR se fixent majoritairement et avec une grande affinité sur des TREs organisés en DR4 (Perlmann, Rangarajan et al. 1993). Les expériences de retard sur gel ont montré que la fixation de cet hétérodimère augmente en présence de T3.

Cependant même en absence de toute stimulation hormonale, on observe la fixation du complexe TR/RXR au niveau du TRE de la FAS. La fixation de ce

complexe en absence de T3 doit être impliquée dans la répression basale de la FAS. En effet, il a déjà été mis en évidence qu'en absence d'hormone, le complexe TR/RXR pouvait interagir avec un élément clef de la machinerie transcriptionnelle TFIIB et donc interférerait dans le mécanisme d'initiation de la transcription (Baniahmad, Ha et al. 1993; Hadzic, Desai-Yajnik et al. 1995). Le mécanisme de répression basale de la FAS doit être maintenu par l'interaction de TFIIB avec les co-répresseurs NCor (Horlein, Naar et al. 1995) et SMRT (Lee, Choi et al. 1995). Il serait donc intéressant de vérifier par des expériences de « super retard sur gel » (supershift) ou par immunoprécipitation de la chromatine (ChIPs assay) la présence de ces co-répresseurs sur le TRE en absence de toute stimulation hormonale. L'ajout de l'hormone devrait en principe entraîner la libération des co-répresseurs et induire la fixation des co-activateurs tels que p160/SRC1 (Onate, Tsai et al. 1995), p300/CBP (Kwok, Lundblad et al. 1994), PCAF (Blanco, Minucci et al. 1998) DRIPs (Yuan, Ito et al. 1998) et DRAPs (Rachez, Lemon et al. 1999). La présence de ces co-activateurs suite à une stimulation par la T3 va par la suite être également examinée grâce à des expériences de « super retard sur gel » (supershift) ou d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIPs assay).

Nous avons aussi clairement mis en évidence que la T3 était capable de réguler la transcription de la FAS *via* un mécanisme d'action non génomique. Nous avons montré que dans des CEH, la T3 était capable d'activer PI3-kinase menant à la phosphorylation en aval des kinases ERK1/2. Différentes études avaient déjà relaté divers effets biologiques induits par l'action non génomique des THs. L'activation de eNOS par la T3 dans des cellules endothéliales vasculaires s'effectue *via* l'activation de la voie PI3-kinase/Akt (Hiroi, Kim et al. 2006) ou *via* l'activation de la voie PI3-Kinase/Akt-PKB/mTor/p70^{S6K} dans des cellules fibroblastiques humaines (Cao, Kambe et al. 2005). Ces études ont clairement montré que l'activation de PI3-kinase a lieu suite à une interaction directe entre le TR et la sous unité régulatrice p85 α de PI3-kinase. Cependant, l'importance de la présence du ligand dans l'interaction TR et p85 α (interaction ligand dépendante ou indépendante) semble être encore sujet à

débat. Dans des cellules fibroblastiques de la peau, l'équipe de Seo a mis en évidence que l'interaction entre TR β 1 et p85 α est indépendante de la présence du ligand (Cao, Kambe et al. 2005).

L'équipe de Ojamaa a obtenu des résultats similaires dans des cardiomyocytes (Kenessey and Ojamaa 2006). Cependant, l'étude réalisée par Liao dans des cellules endothéliales aortique, a clairement mis en évidence que l'interaction entre TR α 1 et p85 α dépendait de la présence de T3 (Hiroi, Kim et al. 2006). Dans cette dernière étude, la surexpression du TR par un adénovirus pourrait peut-être expliquer ces différents résultats obtenus. Il serait donc intéressant de vérifier par immunoprécipitation dans les CEH, si en présence ou en absence de T3, on observe une interaction entre le TR et p85 α et si cette interaction induit l'activation de PI3-kinase.

L'équipe de Davis a montré que les THs étaient capables de se fixer sur un récepteur membranaire aux intégrines (Lin, Davis et al. 1999; Davis, Davis et al. 2005), ce qui induirait l'activation de PKC, Ras, Raf1, MEK et de ERK. De récents travaux réalisés par cette même équipe, montrent que la T3 est capable d'activer la voie MAPK-ERK1/2 par deux mécanismes distincts. Un mécanisme indépendant de PI3-kinase qui activerait la prolifération cellulaire et un mécanisme dépendant de PI3-kinase impliqué dans le trafic des protéines (Sun, Simone et al. 2008). De plus, cette équipe a mis en évidence que la T3 active ces kinases via sa fixation sur un récepteur membranaire aux intégrines (Sun, Simone et al. 2008). Dans des cellules hépatiques, nous avons clairement montré que la T3 active la voie MAPK mais *via* l'activation en amont de PI3-kinase. L'activation de cette voie doit être capable de cibler le TRE et de moduler la transcription de la FAS. Cependant, le mécanisme par lequel la T3 active PI3-kinase reste encore à être élucidé.

Le TR, le RXR ou encore les co-activateurs sont des cibles potentielles de phosphorylation par les MAPK. La phosphorylation du TR favorise entre autres son hétérodimérisation avec le RXR et donc l'augmentation de la fixation du complexe TR/RXR au niveau du TRE (Bhat, Ashizawa et al. 1994). La phosphorylation du TR

par les MAPK favorise également sa translocation vers le noyau (Nicoll, Gwinn et al. 2003), ce qui pourrait donc induire l'augmentation de la transcription de la FAS. Les MAPK peuvent également être impliquées dans le mécanisme d'acétylation du TR *via* CBP/p300 (Lin, Hopkins et al. 2005), ce qui induirait la dissociation des co-répresseurs et la fixation des co-activateurs favorisant ainsi l'augmentation de la transcription (Fu, Rao et al. 2003).

La T3 semble donc réguler la transcriton de la FAS *via* une coopération étroite entre un mécanisme d'action génomique, impliquée dans la fixation d'un complexe hormone/récepteur sur le TRE localisé sur le promoteur FAS et un mécanisme d'action non génomique modulant la phosphorylation ou l'acétylation des protéines nucléaires (TR, RXR, co-activateurs). De plus, ce mécanisme d'action semble être un mécanisme d'action général de régulation, puisque nous avons clairement montré que la T3 était capable de moduler la transcription au niveau d'un DR4, c'est-à-dire un élément de réponse consensus à la T3.

L'équipe de Sul a déjà mis en évidence que l'insuline régule la FAS *via* la fixation de facteurs de transcription au niveau d'une unité de réponse à l'insuline suite à l'activation de la voie PI3-kinase/Akt (Sul et Wang 1998). Dans cette étude, nous avons clairement montré que l'insuline était également capable de moduler la transcription de la FAS directement au niveau du TRE et cela possiblement *via* l'activation de deux voies différentes de signalisation ; la voie PI3-Kinase-Akt et la voie Ras/Raf/MAPK. Ces deux voies pourraient aussi être capables de moduler le niveau de phosphorylation et/ou d'acétylation du TR, du RXR ou encore des co-activateurs activant ainsi la transcription. Il serait intéressant de déterminer si les kinases situées en aval de PI3-kinase *ie* Akt, mTOR et p70S6kinase sont bien les kinases qui modulent l'action de l'insuline sur ce TRE. De plus, il faudra aussi clairement établir si ces 2 voies de signalisation activées par l'insuline (PI3-kinase et Erk 1/2 MAPK) ciblent vraiment le TRE ou si seulement une de ces voies est impliquée. Ceci devra se faire par utilisation de siRNA ciblant spécifiquement des kinases de chaque voie de signalisation, pour les inhiber spécifiquement.

Quand l'insuline et la T3 sont ajoutées en même temps, on observe un important effet synergique sur l'activité, le niveau des ARNm ainsi que sur la transcription de la FAS. Cependant, la T3 et l'insuline ne sont pas capables d'induire cet effet synergique en ciblant uniquement le TRE. Ceci suggère donc que les éléments de réponse à l'insuline localisés en aval du TRE par l'équipe de Sul sont indispensables afin de maximiser les effets de la T3 et de l'insuline sur la transcription de la FAS (Sul et Wang 1998).

CONCLUSION

Dans cette étude, nous avons montré que dans les cellules hépatiques, la T3 régule la transcription de la FAS par un mécanisme d'action génomique. En présence de l'hormone, l'hétérodimère TR/RXR se fixe au niveau de l'élément de réponse à la T3. La fixation de ce complexe va alors être capable de moduler la transcription de la FAS. De plus, la T3 peut également agir via un mécanisme d'action non génomique impliquant l'activation de la PI3-kinase, ce qui entraîne par la suite l'activation de la voie des ERK1/2 MAPK. Cette voie de signalisation est capable de cibler le TRE et de moduler la transcription de la FAS. D'autre part, la fixation de l'insuline sur son récepteur membranaire entraîne l'activation de PI3-kinase, puis de Akt en aval. Cette voie de signalisation module la fixation des facteurs de transcription au niveau de l'IRE mais pourrait également cibler le TRE. Par contre, l'insuline pourrait aussi réguler la FAS au niveau du TRE *via* la voie des Ras/Raf/ERK1/2-MAPK.

Les mécanismes de régulation de la FAS par la T3 et l'insuline ne sont pas totalement élucidés. Il serait donc intéressant de comprendre précisément les mécanismes par lesquels la T3 et l'insuline sont capables de moduler la transcription de la FAS au niveau du TRE ainsi que les mécanismes par lesquels la T3 est capable d'activer PI3-kinase.

De plus, une étude plus approfondie sur la compréhension du mécanisme d'action des MCFAs au niveau du TRE dans l'inhibition de la FAS pourrait en faire des « alicaments » très intéressants pour lutter contre l'obésité.

REFERENCES

- Amy, C. M., B. Williams-Ahlf, et al. (1992). "Intron-exon organization of the gene for the multifunctional animal fatty acid synthase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(3): 1105-8.
- Amy, C. M., A. Witkowski, et al. (1989). "Molecular cloning and sequencing of cDNAs encoding the entire rat fatty acid synthase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(9): 3114-8.
- Andersson, M. L., K. Nordstrom, et al. (1992). "Thyroid hormone alters the DNA binding properties of chicken thyroid hormone receptors alpha and beta." *Nucleic Acids Res* **20**(18): 4803-10.
- Avruch, J. (1998). "Insulin signal transduction through protein kinase cascades." *Mol Cell Biochem* **182**(1-2): 31-48.
- Azzout-Marniche, D., D. Becard, et al. (2000). "Insulin effects on sterol regulatory-element-binding protein-1c (SREBP-1c) transcriptional activity in rat hepatocytes." *Biochem J* **350 Pt 2**: 389-93.
- Back, D. W., M. J. Goldman, et al. (1986). "The fatty acid synthase gene in avian liver. Two mRNAs are expressed and regulated in parallel by feeding, primarily at the level of transcription." *J Biol Chem* **261**(9): 4190-7.
- Baniahmad, A., I. Ha, et al. (1993). "Interaction of human thyroid hormone receptor beta with transcription factor TFIIB may mediate target gene derepression and activation by thyroid hormone." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(19): 8832-6.
- Bassett, J. H., C. B. Harvey, et al. (2003). "Mechanisms of thyroid hormone receptor-specific nuclear and extra nuclear actions." *Mol Cell Endocrinol* **213**(1): 1-11.
- Bhat, M. K., K. Ashizawa, et al. (1994). "Phosphorylation enhances the target gene sequence-dependent dimerization of thyroid hormone receptor with retinoid X receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(17): 7927-31.
- Bigler, J. and R. N. Eisenman (1995). "Novel location and function of a thyroid hormone response element." *Embo J* **14**(22): 5710-23.

- Blake, W. L. and S. D. Clarke (1990). "Suppression of rat hepatic fatty acid synthase and S14 gene transcription by dietary polyunsaturated fat." *J Nutr* **120**(12): 1727-9.
- Blanco, J. C., S. Minucci, et al. (1998). "The histone acetylase PCAF is a nuclear receptor coactivator." *Genes Dev* **12**(11): 1638-51.
- Bocos, C., M. Gottlicher, et al. (1995). "Fatty acid activation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)." *J Steroid Biochem Mol Biol* **53**(1-6): 467-73.
- Brent, G. A., M. K. Dunn, et al. (1989). "Thyroid hormone aporeceptor represses T3-inducible promoters and blocks activity of the retinoic acid receptor." *New Biol* **1**(3): 329-36.
- Brown, A. J., S. Jupe, et al. (2005). "A family of fatty acid binding receptors." *DNA Cell Biol* **24**(1): 54-61.
- Burton, D. N., J. M. Collins, et al. (1969). "The effects of nutritional and hormonal factors on the fatty acid synthetase level of rat liver." *J Biol Chem* **244**(16): 4510-6.
- Cao, X., F. Kambe, et al. (2005). "Thyroid hormone induces rapid activation of Akt/protein kinase B-mammalian target of rapamycin-p70S6K cascade through phosphatidylinositol 3-kinase in human fibroblasts." *Mol Endocrinol* **19**(1): 102-12.
- Cook, C. B., I. Kakucska, et al. (1992). "Expression of thyroid hormone receptor beta 2 in rat hypothalamus." *Endocrinology* **130**(2): 1077-9.
- Dai, G., O. Levy, et al. (1996). "Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter." *Nature* **379**(6564): 458-60.
- Darling, D. S., J. Burnside, et al. (1989). "Binding of thyroid hormone receptors to the rat thyrotropin-beta gene." *Mol Endocrinol* **3**(9): 1359-68.
- Davis, P. J., F. B. Davis, et al. (2005). "Membrane receptors mediating thyroid hormone action." *Trends Endocrinol Metab* **16**(9): 429-35.
- Davis, P. J., J. L. Leonard, et al. (2008). "Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone." *Front Neuroendocrinol* **29**(2): 211-8.
- Davis, P. J., A. Shih, et al. (2000). "Thyroxine promotes association of mitogen-activated protein kinase and nuclear thyroid hormone receptor (TR) and causes serine phosphorylation of TR." *J Biol Chem* **275**(48): 38032-9.

- Eberle, D., B. Hegarty, et al. (2004). "SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis." *Biochimie* **86**(11): 839-48.
- Etherton, T. D. (2000). "The biology of somatotropin in adipose tissue growth and nutrient partitioning." *J Nutr* **130**(11): 2623-5.
- Flamant, F. and J. Samarut (2003). "Thyroid hormone receptors: lessons from knockout and knock-in mutant mice." *Trends Endocrinol Metab* **14**(2): 85-90.
- Forman, B. M., J. Casanova, et al. (1992). "Half-site spacing and orientation determines whether thyroid hormone and retinoic acid receptors and related factors bind to DNA response elements as monomers, homodimers, or heterodimers." *Mol Endocrinol* **6**(3): 429-42.
- Fu, M., M. Rao, et al. (2003). "Acetylation of androgen receptor enhances coactivator binding and promotes prostate cancer cell growth." *Mol Cell Biol* **23**(23): 8563-75.
- Fu, M., M. Rao, et al. (2004). "The androgen receptor acetylation site regulates cAMP and AKT but not ERK-induced activity." *J Biol Chem* **279**(28): 29436-49.
- Fu, M., C. Wang, et al. (2004). "Acetylation of nuclear receptors in cellular growth and apoptosis." *Biochem Pharmacol* **68**(6): 1199-208.
- Gandemer, G., G. Pascal, et al. (1980). "[De novo lipogenesis: kinetics of in vivo incorporation of tritiated water 3H into fatty acids and total lipids of the liver, plasma, adipose tissue and carcass of the male rat]." *C R Seances Acad Sci D* **290**(23): 1479-82.
- Goodridge, A. G., D. W. Back, et al. (1986). "Regulation of genes for enzymes involved in fatty acid synthesis." *Ann N Y Acad Sci* **478**: 46-62.
- Hadzic, E., V. Desai-Yajnik, et al. (1995). "A 10-amino-acid sequence in the N-terminal A/B domain of thyroid hormone receptor alpha is essential for transcriptional activation and interaction with the general transcription factor TFIIB." *Mol Cell Biol* **15**(8): 4507-17.
- Hiroi, Y., H. H. Kim, et al. (2006). "Rapid nongenomic actions of thyroid hormone." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(38): 14104-9.

- Hodin, R. A., M. A. Lazar, et al. (1990). "Differential and tissue-specific regulation of the multiple rat c-erbA messenger RNA species by thyroid hormone." *J Clin Invest* **85**(1): 101-5.
- Holzer, K. P., W. Liu, et al. (1989). "Molecular cloning and sequencing of chicken liver fatty acid synthase cDNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(12): 4387-91.
- Horlein, A. J., A. M. Naar, et al. (1995). "Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor." *Nature* **377**(6548): 397-404.
- Hu, X. and M. A. Lazar (1999). "The CoRNR motif controls the recruitment of corepressors by nuclear hormone receptors." *Nature* **402**(6757): 93-6.
- Inoue, A., N. Yamamoto, et al. (1989). "Unesterified long-chain fatty acids inhibit thyroid hormone binding to the nuclear receptor. Solubilized receptor and the receptor in cultured cells." *Eur J Biochem* **183**(3): 565-72.
- Iritani, N., N. Nishimoto, et al. (1992). "Regulation of hepatic lipogenic enzyme gene expression by diet quantity in rats fed a fat-free, high carbohydrate diet." *J Nutr* **122**(1): 28-36.
- Jakobsson, A., R. Westerberg, et al. (2006). "Fatty acid elongases in mammals: their regulation and roles in metabolism." *Prog Lipid Res* **45**(3): 237-49.
- Jones, K. E., J. H. Brubaker, et al. (1994). "Evidence that phosphorylation events participate in thyroid hormone action." *Endocrinology* **134**(2): 543-8.
- Jump, D. B., S. D. Clarke, et al. (1994). "Coordinate regulation of glycolytic and lipogenic gene expression by polyunsaturated fatty acids." *J Lipid Res* **35**(6): 1076-84.
- Kakuma, T., Y. Lee, et al. (2000). "Leptin, troglitazone, and the expression of sterol regulatory element binding proteins in liver and pancreatic islets." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(15): 8536-41.
- Katsurada, A., N. Iritani, et al. (1990). "Effects of nutrients and hormones on transcriptional and post-transcriptional regulation of acetyl-CoA carboxylase in rat liver." *Eur J Biochem* **190**(2): 435-41.

- Kenessey, A. and K. Ojamaa (2006). "Thyroid hormone stimulates protein synthesis in the cardiomyocyte by activating the Akt-mTOR and p70S6K pathways." *J Biol Chem* **281**(30): 20666-72.
- Kersten, S. (2001). "Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis." *EMBO Rep* **2**(4): 282-6.
- Kim, J. B., P. Sarraf, et al. (1998). "Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1." *J Clin Invest* **101**(1): 1-9.
- Kohrle, J. (2000). "The deiodinase family: selenoenzymes regulating thyroid hormone availability and action." *Cell Mol Life Sci* **57**(13-14): 1853-63.
- Koolman J., Röhm K.-H. (1999). *Atlas de poche de biochimie*, 2 ème edition, Médecine-Sciences Flammarion
- Kurokawa, R., V. C. Yu, et al. (1993). "Differential orientations of the DNA-binding domain and carboxy-terminal dimerization interface regulate binding site selection by nuclear receptor heterodimers." *Genes Dev* **7**(7B): 1423-35.
- Kusakabe, T., M. Maeda, et al. (2000). "Fatty acid synthase is expressed mainly in adult hormone-sensitive cells or cells with high lipid metabolism and in proliferating fetal cells." *J Histochem Cytochem* **48**(5): 613-22.
- Kusunoki, J., A. Kanatani, et al. (2006). "Modulation of fatty acid metabolism as a potential approach to the treatment of obesity and the metabolic syndrome." *Endocrine* **29**(1): 91-100.
- Kwok, R. P., J. R. Lundblad, et al. (1994). "Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB." *Nature* **370**(6486): 223-6.
- Lakshmanan, M. R., C. M. Nepokroeff, et al. (1972). "Control of the synthesis of fatty-acid synthetase in rat liver by insulin, glucagon, and adenosine 3':5' cyclic monophosphate." *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**(12): 3516-9.
- Larsen, P. R. and M. J. Berry (1995). "Nutritional and hormonal regulation of thyroid hormone deiodinases." *Annu Rev Nutr* **15**: 323-52.

- Latasa, M. J., M. J. Griffin, et al. (2003). "Occupancy and function of the -150 sterol regulatory element and -65 E-box in nutritional regulation of the fatty acid synthase gene in living animals." *Mol Cell Biol* **23**(16): 5896-907.
- Lazar, M. A. (1993). "Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities." *Endocr Rev* **14**(2): 184-93.
- Lee, J. W., H. S. Choi, et al. (1995). "Two classes of proteins dependent on either the presence or absence of thyroid hormone for interaction with the thyroid hormone receptor." *Mol Endocrinol* **9**(2): 243-54.
- Leveille, G. A., E. K. O'Hea, et al. (1968). "In vivo lipogenesis in the domestic chicken." *Proc Soc Exp Biol Med* **128**(2): 398-401.
- Li, Q., M. S. Chua, et al. (1998). "Properties and purification of a glucose-inducible human fatty acid synthase mRNA-binding protein." *Am J Physiol* **274**(4 Pt 1): E577-85.
- Lin, H. Y., F. B. Davis, et al. (1999). "Thyroid hormone induces activation of mitogen-activated protein kinase in cultured cells." *Am J Physiol* **276**(5 Pt 1): C1014-24.
- Lin, H. Y., R. Hopkins, et al. (2005). "Acetylation of nuclear hormone receptor superfamily members: thyroid hormone causes acetylation of its own receptor by a mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism." *Steroids* **70**(5-7): 444-9.
- Lin, K. H., K. Ashizawa, et al. (1992). "Phosphorylation stimulates the transcriptional activity of the human beta 1 thyroid hormone nuclear receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(16): 7737-41.
- Loftus, T. M., D. E. Jaworsky, et al. (2000). "Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors." *Science* **288**(5475): 2379-81.
- Lornitzo, F. A., A. A. Qureshi, et al. (1975). "Subunits of fatty acid synthetase complexes. Enzymatic activities and properties of the half-molecular weight nonidentical subunits of pigeon liver fatty acid synthetase." *J Biol Chem* **250**(12): 4520-9.
- Losel, R. M., E. Falkenstein, et al. (2003). "Nongenomic steroid action: controversies, questions, and answers." *Physiol Rev* **83**(3): 965-1016.
- Lynen, F. and S. Ochoa (1953). "Enzymes of fatty acid metabolism." *Biochim Biophys Acta* **12**(1-2): 299-314.

- Ma, L., L. N. Robinson, et al. (2006). "ChREBP*MLx is the principal mediator of glucose-induced gene expression in the liver." *J Biol Chem* **281**(39): 28721-30.
- Moon, Y. S., M. J. Latasa, et al. (2002). "Suppression of fatty acid synthase promoter by polyunsaturated fatty acids." *J Lipid Res* **43**(5): 691-8.
- Mounier (1994) Clonage et caractérisation de la partie promotrice du gène aviaire de l'Acétyl CoA Carboxylase.
- Mounier, C., W. Chen, et al. (1997). "Cyclic AMP-mediated inhibition of transcription of the malic enzyme gene in chick embryo hepatocytes in culture. Characterization of a cis-acting element far upstream of the promoter." *J Biol Chem* **272**(38): 23606-15.
- Mounier, C. and B. I. Posner (2006). "Transcriptional regulation by insulin: from the receptor to the gene." *Can J Physiol Pharmacol* **84**(7): 713-24.
- Moustaid, N., R. S. Beyer, et al. (1994). "Identification of an insulin response element in the fatty acid synthase promoter." *J Biol Chem* **269**(8): 5629-34.
- Moustaid, N. and H. S. Sul (1991). "Regulation of expression of the fatty acid synthase gene in 3T3-L1 cells by differentiation and triiodothyronine." *J Biol Chem* **266**(28): 18550-4.
- Munday, M. R. (2002). "Regulation of mammalian acetyl-CoA carboxylase." *Biochem Soc Trans* **30**(Pt 6): 1059-64.
- Murray, M. B. and H. C. Towle (1989). "Identification of nuclear factors that enhance binding of the thyroid hormone receptor to a thyroid hormone response element." *Mol Endocrinol* **3**(9): 1434-42.
- Nakae, J. and D. Accili (1999). "The mechanism of insulin action." *J Pediatr Endocrinol Metab* **12 Suppl 3**: 721-31.
- Nelson, C. C., S. C. Hendy, et al. (1995). "Relationship between P-box amino acid sequence and DNA binding specificity of the thyroid hormone receptor. The effects of sequences flanking half-sites in thyroid hormone response elements." *J Biol Chem* **270**(28): 16988-94.

- Nicoll, J. B., B. L. Gwinn, et al. (2003). "Compartment-specific phosphorylation of rat thyroid hormone receptor $\alpha 1$ regulates nuclear localization and retention." *Mol Cell Endocrinol* **205**(1-2): 65-77.
- Nohturfft, A., M. S. Brown, et al. (1998). "Topology of SREBP cleavage-activating protein, a polytopic membrane protein with a sterol-sensing domain." *J Biol Chem* **273**(27): 17243-50.
- Oate, S. A., S. Y. Tsai, et al. (1995). "Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily." *Science* **270**(5240): 1354-7.
- Oppenheimer, J. H., H. L. Schwartz, et al. (1987). "Advances in our understanding of thyroid hormone action at the cellular level." *Endocr Rev* **8**(3): 288-308.
- Paulauskis, J. D. and H. S. Sul (1989). "Hormonal regulation of mouse fatty acid synthase gene transcription in liver." *J Biol Chem* **264**(1): 574-7.
- Perlmann, T., P. N. Rangarajan, et al., Eds. (1993). Determinants for selective RAR and TR recognition of direct repeat HREs. *Genes Dev*.
- Rachez, C., B. D. Lemon, et al. (1999). "Ligand-dependent transcription activation by nuclear receptors requires the DRIP complex." *Nature* **398**(6730): 824-8.
- Roncero, C. and A. G. Goodridge (1992). "Hexanoate and octanoate inhibit transcription of the malic enzyme and fatty acid synthase genes in chick embryo hepatocytes in culture." *J Biol Chem* **267**(21): 14918-27.
- Rowan, B. G., N. Garrison, et al. (2000). "8-Bromo-cyclic AMP induces phosphorylation of two sites in SRC-1 that facilitate ligand-independent activation of the chicken progesterone receptor and are critical for functional cooperation between SRC-1 and CREB binding protein." *Mol Cell Biol* **20**(23): 8720-30.
- Samuels, H. H., B. M. Forman, et al. (1988). "Regulation of gene expression by thyroid hormone." *J Clin Invest* **81**(4): 957-67.
- Semenkovich, C. F. (1997). "Regulation of fatty acid synthase (FAS)." *Prog Lipid Res* **36**(1): 43-53.

- Semenkovich, C. F., T. Coleman, et al. (1995). "Human fatty acid synthase mRNA: tissue distribution, genetic mapping, and kinetics of decay after glucose deprivation." *J Lipid Res* **36**(7): 1507-21.
- Semenkovich, C. F., T. Coleman, et al. (1993). "Physiologic concentrations of glucose regulate fatty acid synthase activity in HepG2 cells by mediating fatty acid synthase mRNA stability." *J Biol Chem* **268**(10): 6961-70.
- Shih, A., H. Y. Lin, et al. (2001). "Thyroid hormone promotes serine phosphorylation of p53 by mitogen-activated protein kinase." *Biochemistry* **40**(9): 2870-8.
- Shimokawa, T., M. V. Kumar, et al. (2002). "Effect of a fatty acid synthase inhibitor on food intake and expression of hypothalamic neuropeptides." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(1): 66-71.
- Shimomura, I., Y. Bashmakov, et al. (1999). "Insulin selectively increases SREBP-1c mRNA in the livers of rats with streptozotocin-induced diabetes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(24): 13656-61.
- Stapleton, S. R., D. A. Mitchell, et al. (1990). "Triiodothyronine stimulates transcription of the fatty acid synthase gene in chick embryo hepatocytes in culture. Insulin and insulin-like growth factor amplify that effect." *J Biol Chem* **265**(30): 18442-6.
- Stoops, J. K., M. J. Arslanian, et al. (1975). "Presence of two polypeptide chains comprising fatty acid synthetase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**(5): 1940-4.
- Sugawara, A., P. M. Yen, et al. (1993). "Characterization and tissue expression of multiple triiodothyronine receptor-auxiliary proteins and their relationship to the retinoid X-receptors." *Endocrinology* **133**(3): 965-71.
- Sul, H. S. and D. Wang (1998). "Nutritional and hormonal regulation of enzymes in fat synthesis: studies of fatty acid synthase and mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase gene transcription." *Annu Rev Nutr* **18**: 331-51.
- Sun M., Simone T.M., Keating T., Tang H.Y., Lin C, Moussa S.A., Lin H.Y , Davis F.B., and Davis P.J. [P2-16] Activation by Thyroid Hormone of Mitogen-Activated Protein Kinase and Phosphatidylinositol 3-Kinase: L-Thyroxine vs. 3,5,3-Triiodo-L-Thyronine and Cancer Cell Proliferation. The endocrine Society's 90th annual meeting

POSTER SESSION BASIC -Steroid Nuclear Receptors (AR VDR Throid Receptors, MR) 2008.

- Swierczynski, J., D. A. Mitchell, et al. (1991). "Triiodothyronine-induced accumulations of malic enzyme, fatty acid synthase, acetyl-coenzyme A carboxylase, and their mRNAs are blocked by protein kinase inhibitors. Transcription is the affected step." *J Biol Chem* **266**(26): 17459-66.
- Tai, M. H., S. S. Chirala, et al. (1993). "Roles of Ser101, Asp236, and His237 in catalysis of thioesterase II and of the C-terminal region of the enzyme in its interaction with fatty acid synthase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(5): 1852-6.
- Thompson, C. C. and R. M. Evans (1989). "Trans-activation by thyroid hormone receptors: functional parallels with steroid hormone receptors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(10): 3494-8.
- Thupari, J. N., L. E. Landree, et al. (2002). "C75 increases peripheral energy utilization and fatty acid oxidation in diet-induced obesity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(14): 9498-502.
- Thurmond, D. C., R. A. Baillie, et al. (1998). "Regulation of the action of steroid/thyroid hormone receptors by medium-chain fatty acids." *J Biol Chem* **273**(25): 15373-81.
- Thurmond, D. C. and A. G. Goodridge (1998). "Characterization of thyroid hormone response elements in the gene for chicken malic enzyme. Factors that influence triiodothyronine responsiveness." *J Biol Chem* **273**(3): 1613-22.
- Torra, I. P., N. Ismaili, et al. (2008). "Phosphorylation of liver X receptor alpha selectively regulates target gene expression in macrophages." *Mol Cell Biol* **28**(8): 2626-36.
- Uyeda, K., H. Yamashita, et al. (2002). "Carbohydrate responsive element-binding protein (ChREBP): a key regulator of glucose metabolism and fat storage." *Biochem Pharmacol* **63**(12): 2075-80.
- Wakil, S. J. (1989). "Fatty acid synthase, a proficient multifunctional enzyme." *Biochemistry* **28**(11): 4523-30.
- Wakil, S. J., J. K. Stoops, et al. (1983). "Fatty acid synthesis and its regulation." *Annu Rev Biochem* **52**: 537-79.

- Wang, C., M. Fu, et al. (2001). "Direct acetylation of the estrogen receptor alpha hinge region by p300 regulates transactivation and hormone sensitivity." *J Biol Chem* **276**(21): 18375-83.
- Wang, D. and H. S. Sul (1995). "Upstream stimulatory factors bind to insulin response sequence of the fatty acid synthase promoter. USF1 is regulated." *J Biol Chem* **270**(48): 28716-22.
- Wang, D. and H. S. Sul (1998). "Insulin stimulation of the fatty acid synthase promoter is mediated by the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. Involvement of protein kinase B/Akt." *J Biol Chem* **273**(39): 25420-6.
- Wang, M. Y., Y. Lee, et al. (1999). "Novel form of lipolysis induced by leptin." *J Biol Chem* **274**(25): 17541-4.
- Wang, Y., B. Jones Voy, et al. (2004). "The human fatty acid synthase gene and de novo lipogenesis are coordinately regulated in human adipose tissue." *J Nutr* **134**(5): 1032-8.
- Wilson, S. B., D. W. Back, et al. (1986). "Hormonal regulation of lipogenic enzymes in chick embryo hepatocytes in culture. Expression of the fatty acid synthase gene is regulated at both translational and pretranslational steps." *J Biol Chem* **261**(32): 15179-82.
- Yamashita, H., M. Takenoshita, et al. (2001). "A glucose-responsive transcription factor that regulates carbohydrate metabolism in the liver." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(16): 9116-21.
- Yen, P. M. (2001). "Physiological and molecular basis of thyroid hormone action." *Physiol Rev* **81**(3): 1097-142.
- Yen, P. M., A. Sugawara, et al. (1992). "Triiodothyronine (T3) differentially affects T3-receptor/retinoic acid receptor and T3-receptor/retinoid X receptor heterodimer binding to DNA." *J Biol Chem* **267**(32): 23248-52.
- Yuan, C. X., M. Ito, et al. (1998). "The TRAP220 component of a thyroid hormone receptor-associated protein (TRAP) coactivator complex interacts directly with

nuclear receptors in a ligand-dependent fashion." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(14): 7939-44.

Zhang, Y., R. Proenca, et al. (1994). "Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue." *Nature* **372**(6505): 425-32.

Zhang, Y., L. Yin, et al. (2003). "SREBP-1 integrates the actions of thyroid hormone, insulin, cAMP, and medium-chain fatty acids on ACCalpha transcription in hepatocytes." *J Lipid Res* **44**(2): 356-68.